

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**  
**VILNIAUS UNIVERSITETO ONKOLOGIJOS INSTITUTAS**

Aida Laurinavičienė

**DUKTALINĖS KRŪTIES KARCINOMOS BIOLOGINĖS  
ĮVAIROVĖS TYRIMAS MOLEKULINĖS IR SKAITMENINĖS  
PATOLOGIJOS METODAIS**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06B),  
Citologija, onkologija, kancerologija (B200)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2006 – 2012 metais Vilniaus universiteto Onkologijos institute

Moksliniai vadovai:

**Prof. dr. Sonata Jarmalaitė** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, citologija, onkologija, kancerologija – B200).  
2006 – 2010 m.m.

**Habil. dr. Valerijus Ostapenko** (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B, citologija, onkologija, kancerologija – B200). 2011 – 2012 m.m.

Mokslinis konsultantas:

**Prof. dr. Dainius Characiejus** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B, citologija, onkologija, kancerologija – B200).  
2006 – 2008 m.m.

## TURINYS

1. ĮVADAS .....	8
2. LITERATŪROS APŽVALGA .....	13
2.1. Krūties vėžio rizikos veiksniai ir formavimosi molekuliniai .....	15
mechanizmai .....	15
2.2. Krūties vėžio DNR metilinimo pakitimai .....	16
2.3. Pagrindiniai krūties vėžio žymenys .....	19
2.3.1. Hormonų receptoriai .....	19
2.3.2. <i>HER2</i> onkogenas .....	21
2.3.3. Ląstelių proliferacijos ir kiti imunohistocheminiai žymenys .....	22
2.2.4. Naviką slopinantys genai .....	24
3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI.....	29
3.1. Tiriamųjų atranka ir tyrimo eiga.....	29
3.2. Tyrimo metodai.....	32
3.2.1. Mėginių paruošimas.....	32
3.2.2. Imunohistocheminiai tyrimai .....	35
3.2.3. Vizualus patologo vertinimas.....	40
3.2.4. Skaitmeninė vaizdų analizė.....	41
3.2.5. Imunofluorescenciniai tyrimai .....	44
3.2.6. DNR išskyrimas, metilinimo ir geno mutacijų tyrimai .....	45
3.3. Statistinė analizė .....	50
3.4. Etiniai aspektai.....	51
4. REZULTATAI.....	52
4.1. Imunohistocheminių žymenų raiškos skaitmeninės analizės kalibravimas ...	52

4.1.1. Baltymų raiškos skaitmeninės analizės rezultatų palyginimas su patologo vertinimo rezultatais .....	52
4.1.2. Baltymų raiškos dviejų skaitmeninių analizių rezultatų palyginimas.....	55
4.1.3. Baltymų raiškos skaitmeninės analizės rezultatų palyginimas su analizės fluorescencinės <i>in situ</i> hibridizacijos rezultatais .....	56
4.1.4. Baltymų raiškos skaitmeninės analizės rezultatų palyginimas su analizės stereologiniu metodu rezultatais .....	60
4.2. Krūties duktalinės karcinomos imunohistocheminio tyrimo skaitmeninė analizė .....	64
4.3. Duktalinės krūties karcinomos genetinė analizė .....	69
4.4. Tiriamųjų mėginių analizė pagal naviko biologinį tipą .....	70
4.5. Baltymų raiškos krūties duktalinės karcinomos audinyje tarpusavio.....	72
sąsajos .....	72
4.6. Imunohistocheminių žymenų derinių sąsajos su krūties duktalinės karcinomos charakteristikomis.....	77
4.7. Krūties duktalinių karcinomų, turinčių hormonų receptorių raišką, imunofenotipo faktorinė analizė.....	81
4.8. Krūties duktalinių karcinomų, turinčių hormonų receptorių raišką, atrinktų imunohistocheminių žymenų derinių sąsajos su krūties duktalinės karcinomos charakteristikomis.....	83
4.9. Krūties duktalinės karcinomos imunofenotipo klasterinė analizė ir pagrindinių klasterių charakteristikos.....	84
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	86
6. IŠVADOS.....	95
7. REKOMENDACIJOS.....	97
8. PUBLIKACIJOS IR DISERTACIJOS TEMA SKAITYTI PRANEŠIMAI.....	98
9. CITUOJAMŲ LITERATŪROS ŠALTINIŲ SĄRAŠAS.....	101

10. PRIEDAI .....	113
11. PADĒKA .....	114

## SANTRUMPOS

<b>ASCO</b>	– Amerikos klinikinių onkologų draugija
<b>AR</b>	– androgenų receptorius
<b>BCL2</b>	– baltymas, apoptozės supresorius
<b>CAP</b>	– Amerikos patologų draugija
<b>Cdk</b>	– nuo ciklinų priklausoma kinazė
<b>DAPK1</b>	– apoptozę aktyvinančios kinazės genas
<b>DCIS</b>	– duktalinė <i>in situ</i> karcinoma
<b>ER</b>	– estrogenų receptorius
<b>FDA</b>	– Maisto ir vaistų administracija
<b>FISH</b>	– fluorescencinė <i>in situ</i> hibridizacija
<b>G</b>	– naviko diferenciacijos laipsnis
<b>GSTP1</b>	– glutationo S-transferazės pi genas 1
<b>HER2</b>	– žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2
<b>HER2+</b>	– neluminalinis HER2+ krūties vėžio tipas
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	– atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys
<b>HR</b>	– steroidinių hormonų receptoriai
<b>IHC</b>	– imunohistochemija
<b>Ki67</b>	– ląstelių proliferacijos žymuo
<b>LA</b>	– luminalinis A krūties vėžio tipas
<b>LB</b>	– luminalinis B krūties vėžio tipas
<b>LB HER2+</b>	– luminalinis B HER2+ krūties vėžio tipas
<b>M</b>	– atokiosios metastazės
<b>MGMT</b>	– O <sup>6</sup> -metilguanino DNR metiltransferazės genas
<b>MSP</b>	– metilnimui jautri polimerazės grandininė reakcija
<b>N</b>	– sritinių limfmazgių būklė
<b>NACB</b>	– Nacionalinė klinikinės biochemijos akademija
<b>NCCN</b>	– Nacionalinis išsamių vėžio tyrimų centras
<b>NSG</b>	– naviką slopinantys genai
<b>p14/ARF</b>	– naviką slopinantis genas

<b>p16</b>	– baltymas, vėžio supresorius
<b>p16/</b> <i>INK4α/CDKN2A</i>	– naviką slopinantis genas
<b>p53</b>	– baltymas p53, vėžio supresorius
<b>PR</b>	– progesteronų receptoriaus
<b>PGR</b>	– polimerazinė grandininė reakcija
<b>PSO</b>	– Pasaulinė sveikatos organizacija
<b>RARB</b>	– retinoinės rūgšties receptoriaus β genas
<b>RASSF1</b>	– Ras sąveikos domeną turinčių baltymų šeimos genas 1
<b>SA</b>	– skaitmeninė vaizdo analizė
<b>SATB1</b>	– transkripcijos veiksnys
<b>SSCP</b>	– DNR grandinės konformacijos kitimų nustatymo metodas
<b>T</b>	– naviko stadija
<b>TP53</b>	– p53 baltymą koduojantis genas
<b>Tipas</b>	– biologinis naviko tipas
<b>TMA</b>	– audinių mikrogardelės
<b>TN</b>	– trejopai neigiamas krūties vėžio tipas
<b>VPC</b>	– Valstybinis patologijos centras
<b>VUOI</b>	– Vilniaus universiteto Onkologijos institutas
<b>VV</b>	– vizualus (tyrėjo) skaitmeninio vaizdo vertinimas

## 1. ĮVADAS

Per pastarąjį dešimtmetį vykdyti intensyvūs molekuliniai krūties vėžio tyrimai atskleidė didelę šių navikų biologinę įvairovę. Naujos žinios leido apibrėžti krūties vėžio biologinius subtipus, sparčiau plėtoti genų raiškos tyrimus, leidžiančius tiksliau prognozuoti ligos eigą bei individualizuoti pacientų gydymą.

Krūties vėžio biologinius subtipus galima nustatyti atlikus genų rinkinių [1-3] ir imunohistocheminius tyrimus [4-7]. Išskirtų subtipų krūties vėžio yra skirtingi epidemiologiniai rizikos veiksniai [8, 9], skirtingos prigimtinės charakteristikos [10-12] bei skirtingas atsakas į sisteminę ir vietinę terapiją [13-17].

Nepaisant neginčijamos naujų tiriamųjų sistemų klinikinės naudos, šiuos tyrimus atlikti kasdienėje praktikoje sunku dėl vis dar didelės tyrimų kainos bei šių tyrimų prieinamumo (tyrimai atliekami centralizuotose laboratorijose, dažniausiai naudojant šaldytus nefiksuotus mėginius). Dėl minėtų priežasčių krūties vėžio gydymo klinikinėje praktikoje šiandien vis dar remiamasi įprastais klinikiniais ir patologiniais kriterijais – naviko stadija (T), sritinių limfmazgių būkle (N), histologiniu diferenciacijos laipsniu (G), hormonų receptorių (estrogenų ir progesteronų) raiška ir epidermio augimo faktoriaus 2 hiperekspresija ar geno amplifikacija naviko audinyje. Atotrūkį tarp mokslo sukauptų žinių apie krūties vėžio biologinį profilį ir kasdieninės klinikinės praktikos iš dalies kompensuoja XII tarptautinėje *St Gallen* krūties vėžio konferencijoje (2011) Ekspertų komisijos priimta nauja pacientų klasifikacija sistemei terapijai atlikti, paremta biologiniais krūties vėžio subtipais. Biologiniai naviko subtipai (tipai) apibrėžiami imunohistocheminiu tyrimu nustačius estrogenų receptorių (ER), progesteronų receptorių (PR), epidermio augimo faktoriaus receptorių 2 (HER2) ir ląstelių proliferacijos žymens (Ki67) raišką (1 lentelė). Luminalinio A iš dalies luminalinio B subtipo navikams gydyti skiriama hormonų terapija. Chemoterapija skiriama daugumai pacientų, kuriems nustatytas luminalinis B HER2+ ir trejopai neigiamo subtipo navikas.



Toms pacientėms, kurių naviko audinyje nustatyta HER2 baltymo raiška ar geno amplifikacija, skiriama papildoma biologinė terapija trastuzumabu [18]. Skirtumas tarp luminalinio A ir luminalinio B tipų paremtas naviko proliferacinio aktyvumo įvertinimu atlikus imunohistocheminį tyrimą ir apskaičiavus biožymens Ki67 teigiamų naviko ląstelių procentą.

<b>1 lentelė. Krūties vėžio tipai</b>	
Krūties vėžio tipas	Biologinių žymenų raiška
Luminalinis A (LA)	ER(+) ir/arba PR(+); HER2(-); Ki67 (<14%)
Luminalinis B (LB)	ER(+) ir/arba PR(+); HER2(-); Ki67 (>14%)
Luminalinis B HER2+ (LB HER2+)	ER(+) ir/arba PR(+); HER2(+); Ki67 (bet koks)
HER2+	HER2(+); ER(-); PR(-)
Trejųpiai neigiamas (TN)	ER(-); PR(-); HER2(-)

ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo

XII *St Galleno* konferencijoje Ekspertų komisijos siūlomas „tiltas“ tarp apibrėžtų naviko subtipų ir klinikinės praktikos iš esmės pagrįstas pusiau kiekybiniu biožymenų raiškos vertinimu, todėl išlieka aktuali ribinių verčių nustatymo problematika, paribiniais atvejais pasitaiko, kad navikai priskiriami ne tai navikų klasifikacijos kategorijai. Esminiai pokyčiai imunohistocheminių tyrimų srityje galimi atsiradus skaitmeninio vaizdinimo technologijoms, padedančioms geriau suprasti navikinio audinio morfologiją bei leidžiančiomis imunohistocheminių tyrimų (IHC) rezultatus analizuoti remiantis kiekybiniais parametrais [19-21].

Darbe naudojant skaitmeninį vaizdo analizės metodą tirta 10 IHC žymenų, apimant įprastinius, klinikinėje praktikoje naudojamus žymenis – ER, PR, HER2 ir Ki67 bei mažiau tirtus – androgenų receptorių (AR), BCL2, HIF1 $\alpha$ , SATB1, p53 ir p16, žymenis. Siekiant geriau suprasti krūties navikų molekulinis patogenezės mechanizmus darbe buvo tiriami ir genetiniai – TP53, HER2 – bei epigenetiniai – p14, p16, ESRI, RARB, RASSF1, DAPK1,

*GSTP1*, *MGMT* – pakitimai genuose, susijusiuose su ląstelės atsparumu vėžiui, su ląstelės ciklo ir kitų ląstelės atsakų valdymu.

Tyrimui atrinkti IHC, genetiniai ir epigenetiniai žymenys, kurių padidėjusi raiška, DNR metilinimas ar mutacijos dažnai nustatomi krūties navikuose, o genų koduojami baltymai atlieka svarbų vaidmenį sustiprinant priešvėžinį atsaką ir valdant ląstelės dalijimąsi bei apoptozę.

## MOKSLINIO DARBO AKTUALUMAS IR NAUJUMAS

Vykdamas patikros/prevencijos programas bei diegiant naujas gydymo strategijas, mažėja mirtingumas nuo krūties vėžio. Tačiau, apibendrintais Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) ir Europos Sąjungos duomenimis, kasmet JAV ir Europos Sąjungoje užregistruojama daugiau kaip 120 000 mirties atvejų nuo krūties vėžio [22]. Ši situacija iš dalies paaiškinama tuo, kad vis dar nepakanka informacijos apie krūties vėžio biologinį heterogeniškumą, molekulinis pokyčius, jautrumą gydymui bei ląstelinių audinio sudėtį. Naviko heterogeniškumo problematika ypač aktuali šiandien, siekiant individualizuoti gydymą. Heterogeniškumo fenomenas iki šiol nepaaiškinamas svarbiais klinikiniais parametrais (amžiumi, naviko dydžiu, limfmazgių būkle, diferenciacijos laipsniu) ir biologiniais žymenimis (ER, PR, HER2), kurie naudojami kasdieninėje praktikoje numatant ligos eigos prognozę bei parenkant gydymą.

Per pastaruosius dešimt metų nustatyti ir analizuoti krūties vėžio tipai: LA, LB, LB HER2+, HER2+ ir TN [1, 23]. Atlikti visuminiai genų raiškos tyrimai parodė, kad praktikoje taikomų biologinių žymenų vertė ribota, kad yra daugiau žymenų, svarbių krūties vėžio prognozei nustatyti bei atsakui į terapiją numatyti [24-26]. Vienas pavyzdžių – naviko proliferacinio aktyvumo įvertinimas. Nuo šių metų tarptautinė *St Galleno* Ekspertų kolegija prieš parenkant sisteminę pirminio ankstyvojo krūties vėžio terapiją rekomenduoja įvertinti naviko proliferacijos biologinius žymenis (pvz., Ki67 indeksą ar mitozes) [18].

Mūsų darbe krūties naviko mėginiai pirmą kartą analizuoti naudojant skirtingų tyrimo metodų kompleksą, apimančią genetinių bei epigenetinių pažeidimų ir baltymų raiškos analizės duomenis. Baltymų raiška tirta IHC tyrimo metodu, genų raiška vertinta fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) metodu, genetinių ir epigenetinių pažeidimų analizei pasirinkti šiuolaikiniai tyrimo metodai – sekoskaitos, DNR grandinės konformacijos analizės, metiliniui jautrios PGR ir bisulfitinės sekoskaitos. Atliktas išsamus biologinių žymenų tyrimas leido palyginti svarbių, tačiau nepakankamai ištirtų (p53, AR, p16, BCL2, SATB1, HIF1 $\alpha$ ) IHC žymenų informatyvumą su esamų prognozinių žymenų (ER, PR, HER2, Ki67) rodikliais. Ištirtas platus genetinių ir epigenetinių krūties vėžio žymenų spektras.

Pirmą kartą IHC žymenų rinkinio, įvertinto skaitmeninės analizės būdu, duomenys panaudoti faktorinės analizės metodu nustatyti jų variacijų vidinius veiksnius, atskleidžiančius biologinius dėsningumus ir IHC žymenų bei jų derinių informatyvumą. Šios analizės rezultatai leido naujai įvertinti publikuotų krūties vėžio IHC žymenų bei jų derinių (p16, SATB1, HIF1 $\alpha$ , Ki67/BCL2 ir kt.) informatyvumą.

Šio tyrimo metu mėginių atranka atlikta naudojant audinių mikrogardelių technologiją. Ši technologija leidžia ne tik tiksliai atrinkti pažeistų žmogaus audinių fragmentus, bet ir standartizuotai ištirti kelis šimtus mėginių, taupiai naudojant tiriamuosius audinius ir reagentus.

Šis darbas taip pat yra vienas pirmųjų, kuriame IHC tyrimai atlikti naudojant virtualiosios (skaitmeninės) mikroskopijos vaizdo analizės metodus. Skaitmeninės vaizdų analizės technologijos pastaruoju metu atveria vis daugiau pažangių galimybių kiekybiniais metodais išmatuoti biologinių žymenų raišką tiriamuosiuose audiniuose [27-30]. Šios technologijos plačiai pritaikomos ne tik mokslo tiriamuosiuose darbuose, bet ir atliekant kasdieninius diagnostinius tyrimus. Skaitmeninės vaizdų analizės technologijos pradedamos taikyti praktikoje standartizuojant diagnostinius testus (kokybės kontrolės procedūros) ar vertinant tyrėjų variacijas (pagalba testui interpretuoti). Pastaruoju metu siekiant individualizuoti gydymą, atsiranda vis

didesnis poreikis IHC biologinių žymenų raišką išmatuoti naudojant tikslius kiekybinius analizės metodus ir gauti kiekybines vertes. Be skaitmeninės patologijos vaizdų analizės algoritmų šio poreikio įgyvendinti nebuvo galima [30-33]. Yra darbų, rodančių, kad patologo vertinimo rezultatai stipriai koreliuoja su skaitmeninės analizės tyrimo rezultatais [34-36]. Nustatyta, kad skaitmeninės mikroskopijos analizė leidžia ženkliai sumažinti tyrėjų variacijas interpretuojant IHC tyrimų rezultatus [37]. Kitaip negu įprastas vizualus audinių patologinis tyrimas, skaitmeninė tiriamųjų vaizdų analizė leidžia objektyvizuoti ir kiekybiniais parametrais išmatuoti biologinių žymenų raišką audinyje, nustatyti jų pasiskirstymą audinių bei ląstelių struktūrose. Skaitmeninės analizės metodai leidžia įvertinti ir kitą svarbų biologinių žymenų tyrimų aspektą – navikinio audinio heterogeniškumą. Navikinio audinio heterogeniškumas skaitmeninės analizės bei stereologijos metodais vertintas bendradarbiaujant su partneriais iš Prancūzijos (*François Baclesse Comprehensive Cancer Centre of Caen, Prancūzija*). Disertacinis darbas papildytas naujais duomenimis, išsamiai charakterizuojančiais krūties navikų biologines savybes.

## DARBO TIKSLAS

Taikant molekulinės ir skaitmeninės patologijos tyrimo metodus ištirti pirminių krūties duktalinių karcinomų biologinių pokyčių spektrą, nustatytus pokyčius susieti su klinikinėmis – pataloginėmis ligos charakteristikomis.

## DARBO UŽDAVINIAI

1. Pritaikyti skaitmeninės imunohistocheminių vaizdų analizės metodą kiekybinei baltymų raiškos analizei atlikti ir įvertinti metodo patikimumą rezultatus lyginant su patologo vizualaus vertinimo rezultatais.
2. Duktalinėse krūties karcinomose ištirti baltymų ER, PR, HER2, Ki67, p53, AR, BCL2, p16, SATB1, HIF1 $\alpha$  raišką, genų *ESR1*, *DAPK1*, *GSTP1*,

*MGMT, p14, p16, RARB ir RASSF1* hipermetilinimo, geno *HER2* amplifikacijos bei geno *TP53* mutacijos dažnį.

3. Molekulinės ir skaitmeninės patologijos metodais nustatytą duktalinės krūties karcinomos biologinius profilius susieti su klinikiniais rodikliais ir nustatyti tirtų žymenų prognozinę vertę.

## **2. LITERATŪROS APŽVALGA**

Krūties vėžys – heterogeniška liga, būdinga skirtingiems biologiniams organizmams, pasireiškianti specifiniais morfologiniais ir imunohistocheminiais radiniais bei įvairia klinicine eiga. Kovoiant su šia liga svarbų vaidmenį atlieka biologiniai žymenys, kurie padeda anksti aptikti vėžį, stebėti ligos progresiją, numatyti prognozę bei individualizuoti sergančiųjų krūties vėžiu gydymą. Biologiniai žymenys, susieti su klinikiniais-patologiniais prognoziniais faktoriais, tokiais kaip naviko dydis, diferenciacijos laipsnis, piktybinio proceso invazija į limfagysles bei limfmazgių būklė, svarbūs ir skirstant ligonius į prognozes grupes. Iki šiol pripažinti ir kasdieninėje praktikoje rekomenduojami tik keli ankstyvajam krūties vėžiui gydyti svarbūs biologiniai žymenys, turintys patikimą prognozinę vertę. Vienas svarbiausių predikcinių krūties vėžio žymenų – ER, leidžiantys nustatyti ligos prognozę ir numatyti atsaką į hormonų terapiją. PR taip pat plačiai praktikoje naudojamas žymuo, nors duomenų apie jo vertę sukaupta mažiau. Neseniai šias gretas papildė HER2 biožymuo, leidžiantis patikimai prognozuoti ligos eigą bei svarbus skiriant terapiją trastuzumabu (Herceptin<sup>TM</sup>).

Integruojant diagnostiką ir terapiją onkologijoje, taikinių terapija ir individualizuota medicina šiomis dienomis išgyvena naują erą. Siekiant pacientams parinkti tinkamiausią gydymą, farmacinių kompanijų kuriami antikūnai prieš vėžį gydymui aplejami tik kartu naudojant klinikinį testą, skirtą nustatyti konkretaus biologinio žymens raišką. Žinoma, kad Vakarų pasaulyje taikomas sisteminis adjuvantinis gydymas leido sumažinti

mirtingumą nuo krūties vėžio. Tačiau taip pat žinoma, kad nemažai daliai pacientų taikomas gydymas suteikia daugiau toksinio poveikio nei gydymo naudos. Todėl labai svarbu turėti patikimus prognozinis veiksniai, kurie padėtų pacientams parinkti tinkamiausią gydymą.

Visame pasaulyje krūties vėžys yra dažniausia moterų onkologinė liga ir sudaro apie 23 procentus visų formų vėžio. Pasaulinės sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, kasmet pasaulyje diagnozuojama daugiau nei 1 mln. naujų krūties vėžio atvejų. Sergamumo krūties vėžiu vidurkis įvairiose pasaulio šalyse yra 66,7 atvejo 100 000 moterų. Didžiausi sergamumo rodikliai būdingi išsivysčiusioms šalims, mažiausi – Azijai ir Afrikai. Europoje šis skaičius sudaro apie 350 000 naujų atvejų per metus. Pastarųjų metų Europos sergamumo rodiklių analizė rodo, kad didžiausias sergamumas registruojamas ekonomiškai išsivysčiusiose šalyse – Vakarų Europoje (Prancūzijoje, Belgijoje, Šveicarijoje) ir Šiaurės Europoje (Danijoje, Švedijoje ir Jungtinėje Karalystėje). Mažiausias sergamumas krūties vėžiu – Vidurio ir Rytų Europoje. Lietuvoje sergamumo krūties vėžio rodikliai yra vieni mažiausių Europoje [38], čia kasmet užregistruojama apie 1400 naujų krūties vėžio atvejų [39, 40].

Dėl pradėtų taikyti atrankinių patikros programų, efektyvesnių diagnostinių ir gydymo galimybių bei kintančių rizikos veiksnių pastaraisiais metais gerokai padaugėjo diagnozuotų ankstyvosios stadijos krūties vėžio atvejų [40]. Pažymima, kad daugumoje Europos šalių būdingas mirtingumo nuo krūties vėžio augimo lėtėjimas. Šiaurės Europos šalyse sergamumo didėjimas lydimas mirtingumo mažėjimo. Manoma, kad tai sietina su efektyviai veikiančiomis mamografinės patikros programomis, efektyvesnėmis diagnostinėmis galimybėmis, leidžiančiomis identifikuoti mažiau agresyvių formų bei neinvazinį vėžį, ir efektyvesniu gydymu.

## 2.1. Krūties vėžio rizikos veiksniai ir formavimosi molekuliniai mechanizmai

Krūties vėžio rizikos veiksniai dažniausiai skirstomi į veiksnius, kuriuos galima pakeisti (gyvensena, gimdymas, nežindymas, pakaitinė hormonų terapija, estrogenų terapija, peroraliniai kontraceptikai) ir į veiksnius, kurių pakeisti negalima (lytis, amžius, genetiniai rizikos veiksniai, ankstyvos mėnesinės ir vėlyva menopauzė, patirtas vienos krūties vėžys) [41]. *Bilimoria* savo darbe apibendrina svarbiausius krūties vėžio rizikos veiksnius [42]. Autorius pagal rizikos veiksnius išskyrė keturias krūties vėžio rizikos grupes: krūties vėžys šeimoje (rizika tarp pirmo laipsnio giminių – 1,2–3,0), menstruacinė istorija (santykinė rizika, kai menstruacijų pradžia <12 m. – 1,3, menopauzės pradžia > 55 m. – 1,5–2,0), nėštumas (pirmasis gimdymas 25–29 m. amžiaus grupėje – 1,5, > 30 m. – 1,9, negimdžius – 3,0) ir gerybiniai krūčių navikai (proliferuojantys – 1,9, proliferuojantys esant atipinei hiperplazijai – 4,4, lobulinė karcinoma *in situ* – 6,9–12,0).

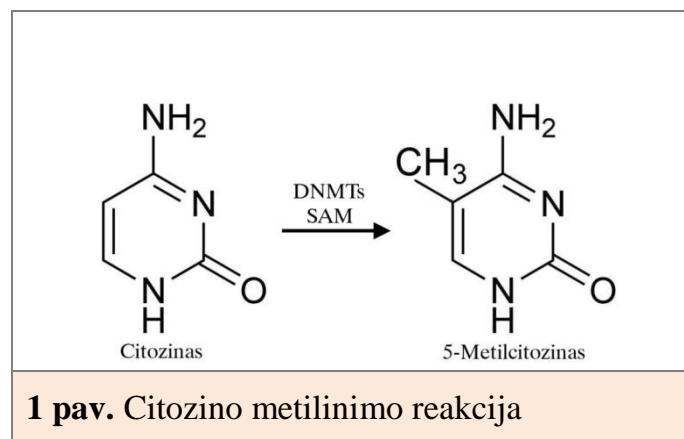
Molekuliniai mechanizmai, sukeltys krūties vėžio vystymąsi, nėra iki galo suprasti, ypač susiję su estrogenų inicijuota kancerogeneze. Manoma, kad krūties vėžiui būdinga nekontroliuojama ląstelių proliferacija ir/arba netipiniai apoptozės reguliavimo mechanizmai. Vykstant minėtiems reiškiniams kaupiasi genetinės pažaidos, aktyvinančios protoonkogenus bei gesinančios naviką slopinančių genų raišką. Genetiniai pokyčiai gali būti įgimti (šeiminės mutacijos) ar sąlygoti aplinkos kancerogenų (somaticinės mutacijos). Pagal klasikinį dviejų pakopų kancerogenezės modelį inicijuotose ląstelėse įvykusios genomo pažaidos yra negrįžtamos, naviko progresavimas – kitas etapas, kurio eiga priklauso nuo epigenetinių, potencialiai grįžtamų procesų.

Naujos tyrimų technologijos padėjo atskleisti vėžio formavimosi mechanizmus. Šiandien žinoma, kad vėžinėms ląstelėms augant ir plintant į gretimus audinius bei organus būdinga: savęs palaikymas augimo signalais, nejautra ląstelės augimą slopinantiems signalams, nevaldomas dalijimasis, apoptozės signalų blokavimas, ląstelės diferenciacijos susilpnėjimas,

angiogenezės stimuliavimas, gebėjimas plisti metastazėmis. Visos šios savybės gali atsirasti ne tik dėl genetinių mutacijų (chromosomų aberacijų, chromosomų skaičiaus pakitimų, taškinių mutacijų, delecijų), bet ir dėl epigenetinių pakitimų – DNR ir histonų modifikacijos, keičiančios genų raišką (hipermetilinimo ir hipometilinimo). Vykstant epigenetiniams persitvarkymams ląstelėje, kai kurių genų sekose CpG salos tampa gausiai metilintos, o kitos – demetilintos. Tokie epigenetinės pusiausvyros pakitimai nulemia ląstelių piktybėjimą ir vėžio vystymąsi.

## 2.2. Krūties vėžio DNR metilinimo pakitimai

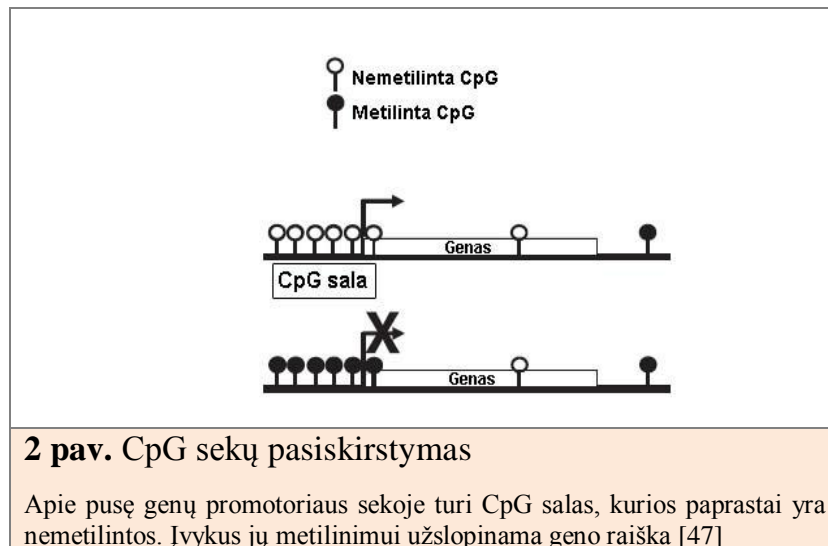
DNR metilinimas yra epigenetinis pakitimas, pakeičiantis genų raišką be tiesioginių persitvarkymų DNR nukleotidų sekoje. Tai poreplikacinė, kovalentinė DNR modifikacija, kurios metu metilo (CH<sub>3</sub>) grupė perkeliama ant citozino C atomo penktoje pozicijoje. Reakciją katalizuoja DNR metiltransferazės, metilo grupės donoras – S-adenozilmetioninas (1 pav.).



DNR metilinimas nėra atsitiktinis procesas. Žmogaus somatinėse ląstelėse metilinti citozinai sudaro nedaug, apie 1 procentą visų DNR bazių [43]. Dauguma metilintų citozinų yra 5'-CG-3' sekoje arba CpG dinukleotiduose. Maždaug pusė žmogaus genų promotorių sekų turi gausius CpG regionus, kurie dar vadinami CpG salomis [44]. Dauguma šių genų,



išskyrus imprintingo būdu valdomus ir neaktyvioje moterų X chromosomoje esančius genus, išlieka nemetilinti. Už salos ribų esantys CpG dinukleotidai yra gausiai metilinami [45]. Pažymima, kad metilinimas geno promotoriuje visiškai užslopina geno raišką, o metilinimas transkribuojamame geno regione gali veikti geno raišką įvairiai [46] (2 pav.).



Metilintos DNR sekos, sąveikaudamos su įvairiais baltymų kompleksais, slopina genų raišką ir neleidžia prisijungti transkripcijos veiksniams prie promotoriaus sekos. Baltymai, atrankiai besijungiantys su metilinta DNR, skatina histonų deacilazių ir histonų metiltransferazių jungimąsi, neaktyvaus ir kompaktiško chromatino susidarymą.

Vienas dažniausių DNR metilinimo pakitimų, nustatomų navikuose, yra CpG salų hipermetilinimas genų promotoriaus regione. Įvairių tipų navikų tyrimai parodė, kad dažniausiai hipermetilinami naviką slopinančių genų (NSG) promotoriai. Įvykus epigenetiniams pakitimams šiuose genuose sutrikdoma ląstelės ciklo reguliacija, DNR reparacija, diferenciacija, apoptozė ir kiti procesai, palaikantys normalų ląstelės funkcionavimą. Pagrindiniai NSG grupės genai ir jų funkcijos ląstelėje išvardyti 2 lentelėje.

2 lentelė. Pagrindiniai naviką slopinantys genai, inaktyvinami vykstant hipermetilinimui	
Funkcijos	Genai, kurių promotoriai hipermetilinti vėžinėse ląstelėse
Ląstelės ciklo kontrolė	<i>Rb, p16, p15, p14, 14-3-3σ, Chfr</i>
DNR pažeidimų reparacija	<i>hMLH1, O<sup>6</sup>MGMT, GSTπ, BRCA1</i>
Kancerogenų metabolizmas	<i>GSTP1, CYP27B1</i>
Apoptozė	<i>DAPK, casp-8, Apaf1, Xiap, p14</i>
Adhezija	<i>E-cad, APC, TIMP3</i>
Replikacinis senėjimas	<i>TERT</i>
Signalų perdavimas	<i>ER, PR, AR, RASSF1, RARB, VHL</i>

Kai kurių NSG, pavyzdžiui, *RASSF1* ir *p16*, promotorių hipermetilinimas yra aptinkamas daugelyje įvairios lokalizacijos ir morfologijos navikų. Kitų genų promotorių metilinimas vyksta specifiskai, tik tam tikrų tipų navikuose. Plaučių karcinomose dažnai hipermetilinami *DAPK1*, *MGMT*, *p16* genai, storžarnės ir skrandžio navikuose – *p14* ir *APC* genai, krūties ir kiaušidžių karcinomose – *GSTP1*, *BRCA1* ir *p16* genai [48]. Pastebima, kad kiekvieno tipo vėžys turi atrankiai hipermetilinamų NSG rinkinį arba DNR metilinimo profilį. Pagal metilinimo profilį galima atskirti naviko histologinius tipus ir apibūdinti turimą naviko mėginį. Taip pat pabrėžiama, kad metilinimo žymenimis gali būti tik tokie genai, kurie normaliose ląstelėse yra nemetilinti [49].

Hipometilinimas – tai DNR metilinimo praradimas. Šis metilinimo pakitimas taip pat dažnas reiškinyje navikinėse ląstelėse. Nustatyta, kad navikinėje ląstelėje metilinto citozino kiekis yra 20–60 procentų mažesnis nei nepakitusioje ląstelėje. Metilo grupės praradimas dažniausiai vyksta hipometilinant geną koduojančias sekas ir intronus bei demetilinant pasikartojančias DNR sekas, kurios sudaro 20–30 procentų žmogaus genomo. Navikinėse ląstelėse globalus hipometilinimas gali sukelti chromosomų nestabilumą, jautriųjų genomo elementų reaktyvinimą ir imprintingo praradimą. Taip pat navikuose dažnai aptinkamas hipometilinimas chromosomos centromeros regione, ir tai gali sukelti aneuploidiją [49]. Yra duomenų, kad

hipometilinimas suaktyvina onkogenus *cMYC* ir *HRAS* [46]. Manoma, kad DNR hipometilinimas vėžinėse ląstelėse skatina naviko invaziją ir metastazes [50]. Svarbu tai, kad hipermetilinimo ir hipometilinimo reiškiniai vyksta kartu toje pačioje navikinėje ląstelėje [50, 51].

## 2.3. Pagrindiniai krūties vėžio žymenys

### 2.3.1. Hormonų receptoriai

Hormonų receptorių (HR) svarba krūties vėžiui vystytis nustatyta daugiau kaip prieš 40 metų. Šiandien žinoma, kad krūties vėžio vystymasis priklauso nuo estrogenų ir/ar progesteronų kiekio ir šį kiekį reguliuoja estrogenų ir progesteronų receptoriai.

ER ir PR priklauso branduolio receptorių šeimai, į kurią įeina ir androgenų receptoriai (AR). Šie receptoriai yra ląstelių branduolyje, kur veikia kaip transkripcijos veiksniai, atlikdami svarbų vaidmenį endokrinių signalų sistemoje. Į ląstelės branduolį difuzijos būdu patekęs estrogenas susijungia su ląstelės branduolyje esančiu ER suformuodamas ligando-receptoriaus kompleksą, galintį sąveikauti su reguliacinėmis genų sekomis [52]. Estrogenas, veikdamas per ER, reguliuoja epitelinio audinio augimą ir diferenciaciją, aktyvina ląstelių proliferaciją bei reguliuoja kitų genų raišką (pS2, PR ir BCL2) [53]. Progesteronui sąveikaujant su PR, sustiprinamas mitozinis veikimas ir taip pat aktyvinama ląstelių proliferacija [54].

**Estrogenų receptoriai**, kaip branduolio transkripcijos veiksniai, dalyvauja krūties audinio vystymosi, augimo, diferenciacijos ir navikų formavimosi procesuose. Žinomos dvi ER izoformos: ER-alfa ( $ER\alpha$ ) ir ER-beta ( $ER\beta$ ). Nors šie receptoriai panašūs daugeliu aspektų, tačiau skiriasi biologinėmis funkcijomis ir raiškos pobūdžiu.  $ER\alpha$  ir  $ER\beta$  koduoja du skirtingi genai, *ESR1* ir *ESR2* atitinkamai [55]. Literatūros duomenimis,  $ER\alpha$  siejamas su krūties vėžio vystymusi. Daugiau nei 70 procentų diagnozuojamų ankstyvųjų krūties navikų yra  $ER\alpha$  teigiami [56] ir vėžio progresijos metu  $ER\alpha$  raiška didėja [57].  $ER\beta$  vaidmuo krūties vėžiui išsivystyti kol kas nėra aiškus

[57, 58]. Padidėjusi ER $\alpha$  raiška pripažinta prognozinium ir prediktyviniu krūties vėžio žymeniu [59], siejama su aukštesniu vėžio diferenciacijos laipsniu ir geresnėmis ligos prognozėmis [52, 60].

**Progesteronų receptorių** raiškos įtaka krūties vėžiui formotis kol kas diskutuotina [61]. Nustatyta, kad ER teigiami, tačiau PR neigiami krūties navikai sąlygoja blogesnę ligos prognozę negu krūties navikai, kurie turi ER ir PR raišką [62, 63]. Vis dėlto prognozinė PR vertė, literatūros duomenimis, išlieka prieštaringa. Yra tyrimų, kuriuos atlikę tyrėjai teigia, kad prognozinė PR vertė numatant krūties vėžio gydymą hormonų terapija mažesnė nei ER, tačiau kiti tyrėjai teigia, kad PR suteikia papildomos informacijos, nepriklausomos nuo ER prognozių verčių [64-66]. Navike nustatyta PR raiška informuoja, kad ER reguliuojami signalų perdavimo keliai funkcionuoja, veikla nesutrikusi. Taip pat nustatyta, kad tiek ER, tiek PR raiška priešingai koreliuoja su histologiniu diferenciacijos laipsniu, proliferacijos indeksu, HER2 ir p53.

Šiandien ER ir PR raiška krūties audiniuose nulemia pirminį krūties vėžio gydymo taktikos parinkimą. Tik įvertinus hormonų receptorių raišką parenkamas gydymas taikant adjuvantinę hormonų terapiją (tamoksifenas), aromatazės inhibitorius bei terapiją selektyviais estrogenų receptorių modulatoriais. HR raiška – svarbus rodiklis, apibrėžiantis naviko atsaką į hormonų terapiją, tai vienas svarbiausių krūties vėžio gydymo parametrų. Metastazuojančio krūties vėžio atveju hormonų terapija turi nemažai privalumų, palyginti su citotoksine chemoterapija. Esant naujai diagnozuotai metastazuojančiai ligai, nuo 30 iki 40 procentų atvejų gaunamas teigiamas atsakas į hormoninį gydymą, nemaža dalis ligonių turi kliniškai reikšmingą ligos nesant recidyvo laikotarpį [20, 67-71].

**Androgenų receptorių** raiška dažnai nustatoma krūties navikuose ir yra susijusi su mažesniu naviko piktybiškumu ir palankesniu naviko diferenciacijos laipsniu. Atlikta nemažai tyrimų, nagrinėjančių AR įtaką krūties vėžio genezėje. Manoma, kad AR gali būti nepriklausomas prognozinis faktorius ar žymuo, svarbus parenkant trejopai neigiamų (ER–, PR–, HER2–)

navikų gydymą, tačiau kol kas svarių duomenų, pagrindžiančių šias hipotezes, nėra [72-79].

Hormonų receptoriams nustatyti audiniuose taikomi du pagrindiniai tyrimo metodai: biocheminis ligando prijungimo metodas – šaldytų mėginių tyrimams ir IHC metodas – mėginių, paruoštų parafino metodu, tyrimams. Per pastaruosius du dešimtmečius krūties vėžio diagnostikai pasirinktas IHC tyrimo metodas, kaip patogesnis, jautresnis ir patikimesnis. Siekiant pagerinti pacientų atranką hormonų terapijai, ASCO (angl. *American Society of Clinical Oncology*) ir CAP (angl. *College of American Pathologists*) nesenai apibrėžė ER/PR tyrimo gaires, kuriose rekomenduoja hormonų raišką tirti IHC tyrimo metodu [80, 81].

### 2.3.2. **HER2 onkogenas**

**HER2** – onkogenas, koduojantis ląstelės 185 kD transmembraninį receptorių, turintį ir tirozino kinazės aktyvumą [82]. HER2 receptorius priklauso epidermio augimo faktoriaus receptorių šeimai (EGFR), kuri aktyvina tarpląstelinių signalų perdavimo kelius, kontroliuojančius epitelio ląstelių augimą, diferenciaciją [83, 84] ir angiogenezę [46, 85]. Anksčiau epidermio augimo faktoriaus receptorius 2 buvo vadinamas NEU, NGL, HER2, TKR1, HER-2, HER2/neu arba cerbB-2. 2007 metais pasiūlyta apsistoti ties dažniausiai vartotu epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2 pavadinimu – HER2 [86].

**HER2** geno amplifikacija ar jo produkto baltymo hiperekspresija ląstelės membranoje pasireiškia nuo 18 iki 20 procentų krūties vėžio atvejų [87-89] ir tai susiję su bloga ligos prognoze bei padidėjusia rizika ligai atsinaujinti [87]. HER2 – ne tik prognozinis agresyvios ligos žymuo, bet ir svarbus veiksnys kliniškai parenkant specifinę terapiją. HER2 receptorius – molekulinis taikinyš monokloniniam antikūnui trastuzumabui (*Herceptin; Genentech, South San Francisco, JAV*), adjuvantui, kuris reikšmingai pagerina atsaką į ligos progresavimą bei prailgina pacientų išgyvenimą, palyginti su išgyvenimu

pacientų, kuriems taikytas vien tik chemoterapinis gydymas [90, 91]. HER2 terapijai parenkami pacientai, kuriems nustatyta HER2 geno hiperekspresija arba geno amplifikacija.

Nuo 2001 metų naujai diagnozuoto ir metastazuojančio krūties vėžio HER2 raišką rutiniškai nustatyti pasiūlė net kelios organizacijos: *ASCO*, *NCCN* (angl. *Nacional Comprehensive Cancer Network*) bei *NACB* (angl. *Nacional Academy of Clinical Biochemistry*) [92-94]. 2007 metais jungtinis ekspertų komitetas, atstovaujantis *ASCO* ir *CAP*, paskelbė rekomendacijas, kuriose išanalizuoti konkretūs techniniai ir analitiniai HER2 tyrimo aspektai [86]. Vadovaujantis šiomis rekomendacijomis bei 2011 *St. Galleno* Ekspertų grupės sutarimu [95], diagnostikoje rekomenduojamas IHC HER2 vertinimo metodas, kuriuo nustatoma baltymo raiška ląstelės membranoje. IHC būdu nustatyti paribiniai atvejai testuojami genų raiškos lygmeniu, atlikus FISH. FISH tyrimas dažnai vadinamas „aukso standartu“, kuris leidžia kiekybiniais parametrais išmatuoti analizuojamo geno raišką [86, 96, 97].

### **2.3.3. Ląstelių proliferacijos ir kiti imunohistocheminiai žymenys**

**Vėžinių ląstelių proliferacija** yra svarbus navikinio audinio prognozinis požymis. Padidėjusi naviko proliferacija koreliuoja su blogesne negydytų pacientų ligos prognoze, aukštu histologiniu diferenciacijos laipsniu, dažnai su hormonų receptorių raiškos nebuvimu, didesniu naviko dydžiu bei pažeistais limfmazgiais [98].

Naviko proliferacija krūties navikuose gali būti vertinama keliais skirtingais tyrimo metodais: mitozijų skaičiavimu, timidino indekso ir S fazės frakcijos nustatymu, tėkmės citometrijos bei IHC tyrimu, naudojant antikūnus prieš proliferuojančių ląstelių antigenus. Geriausiai ląstelių proliferaciją atspindi Ki67 žymuo, kuris išryškinamas IHC metodu su *MIB-1* antikūnu formaline fiksuotuose parafinu impregnuotuose mėginių pjūviuose. Literatūroje pabrėžiama, kad Ki67 raiška ląstelės ciklo metu nevienoda [59, 99]. Nustatyta, kad raiška vyksta  $G_1$ , S ir  $G_2$  fazių metu, tačiau nevyksta

ląstelės ciklo ramybės fazėje  $G_0$ . Nepakitusiame krūties audinyje Ki67 raiška yra labai silpna (< 3 % ląstelių) [99], vėžiniame audinyje labai padidėja.

Ki67 proliferacijos indeksas tiksliai išmatuojamas kiekybiniais stereologijos ir skaitmeninės analizės tyrimo metodais, skaičiuojant ląsteles nustatytame analizės plote [100]. Daugelis klinikinių tyrimų parodė, kad egzistuoja stiprus Ki67 proliferacijos indekso ryšys su ligos prognoze, koreliacija su išgyvenimo nesant recidyvo ir bendrojo išgyvenimo laikotarpiu [101, 102]:

- naudojant Ki67 slenkstines vertes nuo 3,5 iki 34 procentų nustatyta Ki67 teigiama vertė susijusi su reikšmingai didesne recidyvo rizika tiek esant invazijai į limfmazgius, tiek nesant invazijos;
- taip pat nustatytas reikšmingas ryšys tarp Ki67 teigiamos vertės ir trumpesnio išgyvenimo tiek esant naviko invazijai į limfmazgius, tiek jo nesant.

2007 metais *ASCO/CAP* išleistose krūties vėžio tyrimo gairėse rekomenduojama Ki67 indeksą nustatyti visais krūties vėžio tyrimo atvejais [61].

**Baltymas SATB1** (angl. *special AT-rich sequence-binding protein-1*) dažnai vadinamas „genomo organizatoriumi“, galinčiu koordinuoti daugiau kaip 10 procentų visų genų veiklą. Spėjama, kad šis baltymas gali atlikti reikšmingą vaidmenį vystantis ir progresuojant krūties vėžiui. 2008 metais Han su bendraautoriais teigė, kad SATB1 baltymo raiška padidėja naviko genezės metu, keisdama krūties vėžio ląstelių genų ekspresijos profilį, kuris palaiko agresyvių ląstelių fenotipą, skatinantį naviko augimą ir metastazavimą [103]. 2010 metais Iorns su tyrėjų grupe, kitaip negu ankstesni tyrėjai, nustatė, kad SATB1 raiška neskatina krūties vėžio progresavimo ir nėra susijusi su krūties vėžio eiga [103]. Šiuo metu tyrėjų nuomonė apie SATB1 vaidmenį vystantis krūties vėžiui gana kontroversiška.

**HIF1 $\alpha$**  (angl. *hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit*), transkripcijos veiksnys, kontroliuojantis ląstelės atsaką į hipoksiją. Indukuojamo subvieneto HIF1 $\alpha$  raiška ženkliai padidėjusi daugelyje navikų, tarp jų ir krūties. Dėl

baltymo veiklos sustensyvėja vaskuliarizacija naviko zonoje, padidėjęs baltymo kiekis koreliuoja su naviko agresyvumu, kontroliuoja ląstelės atsaką į hipoksiją. Indukuojamo subvieneto HIF1 $\alpha$  raiška ženkliai padidėjusi daugelyje navikų.

**BCL2** (angl. *B-cell lymphoma 2*) šeimos baltymai reguliuoja programuotos ląstelių mirties arba apoptozės procesus. *BCL2* genas koduoja mitochondrijų membranos baltymą, kuris palaiko mitochondrijų membranos integralumą ir slopina ląstelių (pvz., limfocitų) apoptozinę mirtį. Padidėjusi baltymo raiška nustatoma daugelyje navikų, tarp jų ir krūties navikuose. Baltymo kiekio padidėjimas slopina natūralų piktybėjančių ląstelių pašalinimą apoptozės būdu, skatina vėžio progresiją, naviko didėjimą. Yra žinoma, kad BCL2 baltymo raiška susijusi su žemesniu naviko diferenciacijos laipsniu bei lėčiau proliferuojančiais, didesnės ER raiškos navikais [104, 105]. Atliktuose tyrimuose nustatyta, kad BCL2 baltymo raiška koreliuoja su ilgesniu pacientų, kuriems būdinga ER raiška, išgyvenimo nesant ligos atkryčio laikotarpiu ir gali būti nepriklausomu ankstyvųjų krūties vėžio stadijų, geresnės prognozės žymeniu [106].

#### 2.2.4. Naviką slopinantys genai

Naviką slopinančio geno **TP53** mutacijos ar pakitusi baltymo **p53** (angl. *tumor protein 53*) raiška aptinkama nuo 20 iki 50 procentų žmogaus krūties vėžio atvejų [107, 108]. Prognozinė ir predikcinė p53 vertė šiandien tyrėjų dar vertinama prieštaringai. Dalis tyrimų parodė, kad padidėjusi baltymo p53 raiška (išmatuota IHC tyrimo metodu), mutacijos ir delecijos *TP53* gene, yra stiprus nepriklausomas prognozinis veiksnys, reiškiantis trumpesnę išgyvenimo be recidyvo bei bendrojo išgyvenimo laikotarpį. Manoma, kad IHC tyrimo metodu nustatytos p53 baltymo sankaupos audinyje ne tik koreliuoja su geno *TP53* mutacija, bet ir yra patikimas nepriklausomas trumpesnio išgyvenimo žymuo [109-115]. Tačiau yra tyrimų, kurių metu tokios sąsajos nerasta [109, 116, 117].



p53 baltymą koduoja *TP53* genas, esantis 17-os chromosomos trumpajame petyje (17p13.1). Tai transkripcijos faktorius, reguliuojantis ląstelės ciklą, apoptozę ir DNR pažaidų taisymą. Baltymas p53 sintetinamas visose organizmo ląstelėse. Nemutavusios būklės p53 veikia kaip ląstelės piktybėjimo supresorius. p53 yra universalus natūralaus ląstelės sunykimo, arba apoptozės, reguliatorius, be to, jis dalyvauja ir pažeistos DNR atkūrimo procese. Normaliose, streso nepažeistose ląstelėse p53 baltymo kiekis ir aktyvumas labai mažas. Tuo tarpu streso pažeistose ląstelėse p53 baltymas suaktyvinamas.

*ASCO* tyrėjų grupė mano, jog mažai tikėtina, kad nustatant baltymo p53 raišką IHC tyrimo metodu bus gaunami pakankamai tikslūs rezultatai, leidžiantys numatyti klinikos eigą. Patikimesnis būdas p53 būklei įvertinti yra *TP53* geno sekoskaita [61].

**p16<sup>INK4a</sup>/p14<sup>ARF</sup> lokusas**, esantis 9p21 chromosomoje, koduoja du struktūriškai skirtingus baltymus, kurie susidaro dėl alternatyvaus rėmelio nuskaitymo. Abu genai (*p16<sup>INK4a</sup>* ir *p14<sup>ARF</sup>*) koduoja naviką slopinančius baltymus, dalyvaujančius valdant ląstelės ciklą ir reguliuojančius Rb bei p53 signalinius kelius.

Baltymas p14<sup>ARF</sup> dalyvauja p53 signaliniame kelyje ir yra svarbus G<sub>1</sub> ir G<sub>2</sub> ląstelės ciklo fazių eigai. p14<sup>ARF</sup> baltymas palaiko vėžio supresoriaus p53 stabilumą, kuris, esant onkogeniniams signalams ar kitoms pažaidoms, stabdo ląstelės ciklą ir inicijuoja apoptozę [118]. Nesant aktyvaus p14, naviką slopinančio baltymo p53 stabilumas smarkiai sumažėja.

Genas *p16* koduoja baltymą, nuo ciklinų priklausomos kinazės (Cdk) inhibitorių, kuris dalyvauja baltymo Rb atsako kelyje. p16<sup>INK4a</sup> baltymas jungiasi prie Cdk4 ir Cdk6 ir inhibuoja fermentinio komplekso Cdk4-Cdk6/ciklino D susidarymą G1 ląstelės ciklo fazėje. Šis kompleksas svarbus Rb fosforilinimo procesui. Nesusidarius šiam kompleksui, nevyksta Rb fosforilinimas ir ląstelės ciklas sulaikomas G1/S fazėje. Ląstelėse, neturinčiose aktyvaus p16, ląstelės dalijimosi ciklas nestabdomas G1/S fazėje ir tampa

nekontroliuojamas. Taigi p16 baltymas palaiko Rb baltymą nefosforilintos būklės inhibuodamas ląstelės ciklo progresiją iš G1 į S stadiją.

Genai *p14* ir *p16* dažnai inaktyvinami įvairiausiuose žmogaus navikuose. Vienas iš inaktyvinimo būdų yra promotoriaus regione esančių CpG salų hipermetilinimas. Literatūroje pateikiami geno *p14* hipermetilinimo dažniai krūties karcinomose svyruoja nuo 28 iki 47 % [119, 120], tačiau yra autorių, kurie geno *p14* hipermetilinimo nenustatė [121]. Geno *p16* raiškos sumažėjimas koreliuoja su sunkia ligos eiga ir mažesniu išgyvenamumu. Geno hipermetilinimo dažniai nustatomi krūties karcinomose, įvairiose publikacijose svyruoja nuo 26 iki 44 % [122, 123].

**RARB genas** (angl. *retinoic acid receptor beta*) – tai retinoinės rūgšties receptoriaus  $\beta$  genas, esantis 3p24 chromosomoje ir priklausantis branduolio receptorių RAR klasei. RAR branduolio receptorių klasei priklauso trys skirtingi genai ( $\alpha$ ,  $\beta$  ir  $\gamma$ ). Tai transkripcijos veiksniai, kurių raiška vyksta skirtingais organizmo vystymosi etapais. Manoma, kad RARB yra svarbus epitelinių ląstelių augimo reguliavimui bei kancerogenezės procesui [124]. RAR šeimos receptoriai būna ląstelės citozolyje ir branduolyje. Šios šeimos receptorių ligandas yra retinoinė rūgštis, vitamino A biologiškai aktyvi forma, kuri svarbi ląstelei dalytis, diferencijuotis ir perduoti morfogenezės signalams [125].

Susilpnėjusi *RARB* geno raiška vėžinėse ląstelėse yra siejama su promotoriaus regione esančių CpG salų metilinimo pakitimais. Geno hipermetilinimas aptinkamas krūties, plaučių, prostatos, gaubtinės žarnos, skrandžio, gimdos kaklelio bei šlapimo pūslės navikuose [126]. Literatūros duomenimis, geno *RARB* hipermetilinimo dažnis krūties navikuose svyruoja nuo 10 iki 38 procentų [122, 127-129].

**RASSF1 genas** (angl. *Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1*) – RAS sąveikos domeną turinčių baltymų šeimos narys. *RASSF1* genas yra 3p21.3 chromosomoje, jo produktas RASSF1A baltymas dalyvauja ląstelės ciklo valdymo, apoptozės reguliacijos ir mikrovamzdelių stabilizacijos procesuose.

RASSF1A yra mitozės inhibitorius, sustabdantis ląstelės ciklą metafazėje. Tai svarbu tam, kad chromosomos taisyklingai išsirikiuotų metafazinėje plokštelėje [55]. RASSF1A taip pat dalyvauja apoptozės reguliacijoje, sąveikaudamas su vienu iš Ras (K-Ras) šeimos baltymų, kuris svarbus inicijuojant apoptozę [130].

Epigenetinis geno *RASSF1* nuslopinimas yra vienas iš dažniausių molekulinų pakitimų navikuose. Šio geno promotoriuje esančių CpG salų hipermetilinimas nustatytas įvairių tipų navikuose, tarp jų plaučių, prostatos, inkstų, neuroblastomos, gliomos, krūties. Genų hipermetilinimo dažniai, nustatomi krūties karcinomose, įvairiose publikacijose svyruoja nuo 42 iki 85% [127, 129, 131]. Siūloma metilintą *RASSF1* geną laikyti biologiniu žymeniu diagnozuojant ankstyvuosius vėžinius pakitimus žmogaus organizme [132].

**DAPK1 genas** (angl. *Death-associated protein kinase*) koduoja serino/treonino kinazę. Genas yra 9 chromosomos trumpajame petyje (9q 34.1), koduojamas produktas DAPK dalyvauja apoptozės procese. DAPK yra kalcio/kalmodulino reguliuojama baltymų kinazė. Baltymo struktūroje yra ankirino pasikartojantis domenas ir mirties domenas, kurie padeda DAPK sąveikauti su kitais baltymais [133]. Cohen [134] parodė, kad DAPK dalyvauja TNF $\alpha$  (angl. *tumor necrosis factor*) ir Fas receptorių indukuotoje ląstelių apoptozėje. Nustatytas antimetastazinis [134] ir naviką slopinantis DAPK1 aktyvumas [135]. Hipermetilinimas *DAPK1* geno promotoriaus sekoje koreliuoja su blogomis prognozėmis daugelio tipų navikuose: plaučių, inkstų, storžarnės, gimdos kaklelio. Literatūros duomenimis, krūties navikuose hipermetilinimas varijuoja nuo 16 [136]) iki 50 procentų [137].

**GSTP1 genas** (angl. *glutathione S-transferase pi 1*) koduoja kenksmingas medžiagas detoksikuojantį fermentą glutation-S-transferazę  $\pi$  (GST- $\pi$ ). Genas yra 11 chromosomos trumpajame petyje (11q 13). GST- $\pi$  raiška nepakituosiuose audiniuose intensyviausiai vyksta šlapimtakių, virškinimo ir kvėpavimo takuose. Padidėjęs GST- $\pi$  kiekis siejamas su tam tikro kancerogeno poveikiu [138], o geno *GSTP1* raiškos nebuvimas padidina

vėžio išsivystymo tikimybę [139]. Be to, užslopinta geno raiška turi įtakos vėžinių ląstelių jautrumui chemoterapiniams vaistams [140].

Metilinimas geno *GSTP1* CpG salose nutatytas kelių tipų navikiniuose audiniuose, tarp jų krūties (nuo 13 iki 31 procentų [128, 140, 141]) ir kepenų, o prostatos navikuose nustatytas didžiausias šio geno hipermetilinimo dažnis (apie 90 procentų).

***MGMT* genas** (angl. *O*-6-methylguanine-DNA methyltransferase) koduoja DNR reparacijos fermentą O<sup>6</sup>-metilguanino DNR metiltransferazę (EC2.1.1.64). Genas yra 10 chromosomos trumpajame petyje (10q 26). *MGMT* pašalina mutageninius ir citotoksinius aduktus nuo guanino nukleotido šeštoje pozicijoje esančio deguonies ir apsaugo ląstelę nuo mutacijų kaupimosi. *MGMT* raiška vyksta visuose nepakitusiuose žmogaus audiniuose, tačiau baltymo lygis varijuoja tarp organų ir tarp individų.

Žmogaus navikuose *MGMT* geno mutacijos ar delecijos retos. Dažniausiai *MGMT* genas užslopinamas dėl epigenetinių pakitimų promotoriaus regione [142]. Dėl nuslopintos *MGMT* raiškos padidėja svarbių genų (*TP53*, *K-RAS*) mutacijų tikimybė. Be to, navikai, kuriuose *MGMT* yra metilintas, jautresni terapiniam alkilinančių priešvėžinių vaistų veikimui [143]. Krūties navikuose šio geno epigenetiniai pakitimai tyrinėti mažai. Literatūroje pateikiami *MGMT* hipermetilinimo dažniai krūties navikuose – 8,4 % [121] ir 10 % [144].

Tyrimui atrinkti aukščiau aprašyti IHC, genetiniai ir epigenetiniai žymenys, kurių padidėjusi raiška, mutacijos ar DNR metilinimas dažnai nustatomi krūties navikuose. Darbe planuota naujai atsiradusiomis žymenų raiškos analizės priemonėmis išanalizuoti plačiai klinikinėje praktikoje naudojamus bei naujus, menkai tyrinėtus žymenis.

### 3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI

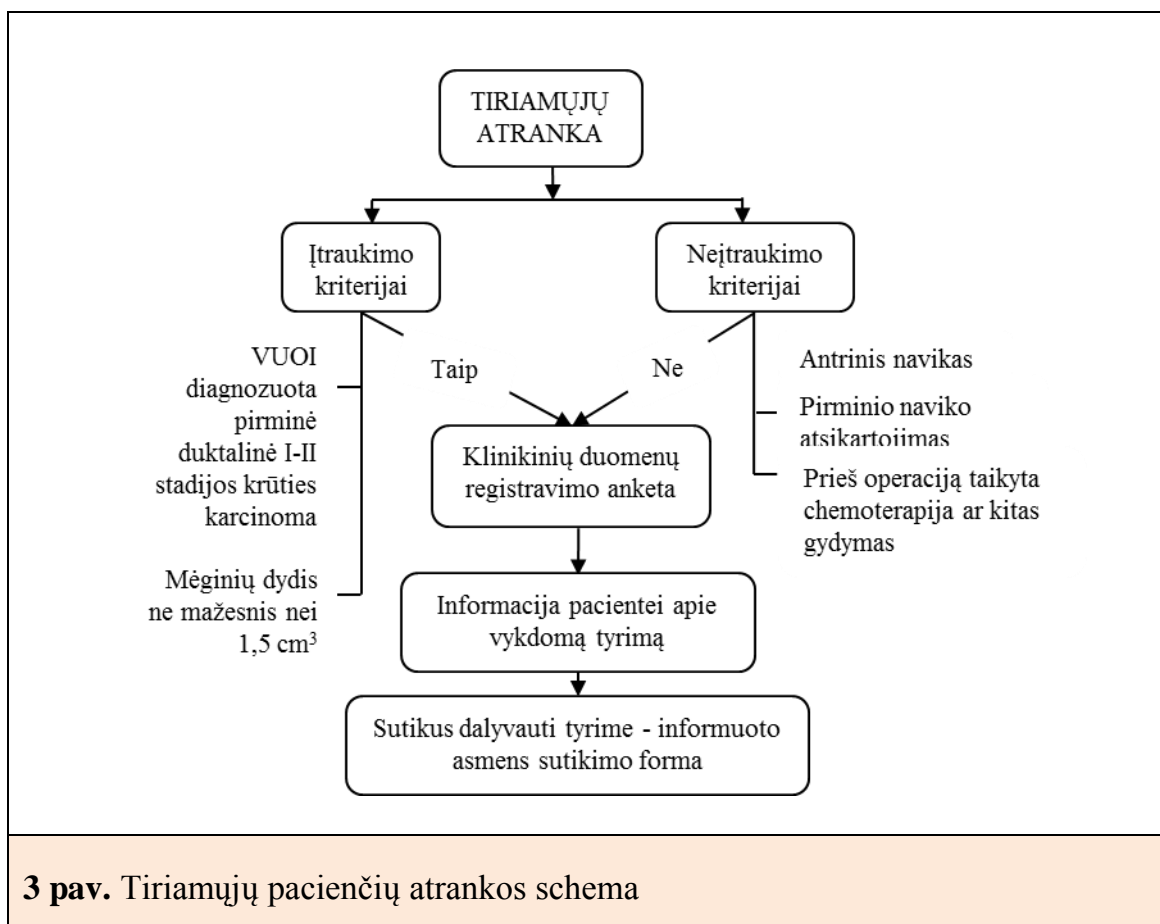
#### 3.1. Tiriamųjų atranka ir tyrimo eiga

**Tyrimo rūšis** – perspektyvinis žvalgomasis.

**Tyrimo populiacija** – 203 pacientės, kurioms tyrimo periodu (2006–2009 m.) Vilniaus universiteto Onkologijos institute (VUOI) diagnozuota I–II stadijos pirminė duktalinė krūties karcinoma (3 pav.).

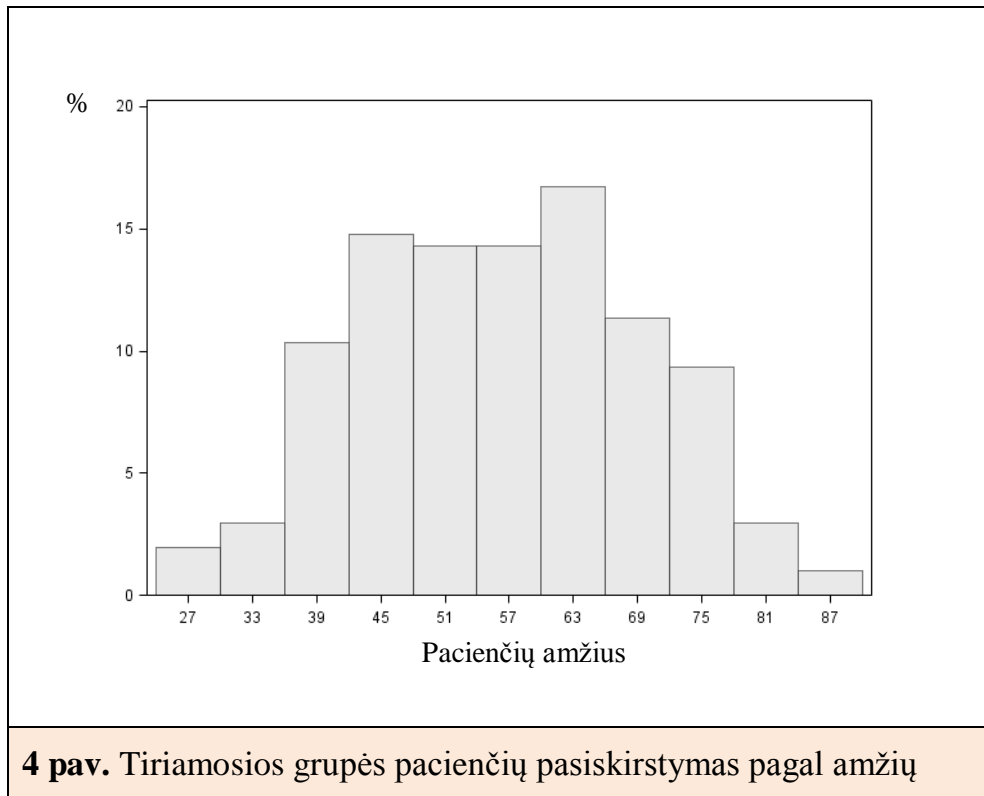
**Įtraukimo į tiriamąją grupę kriterijai** – pirminė duktalinė I-II stadijos krūties karcinoma (T1N0, T1N1, T2N0, T2N1).

**Neįtraukimo kriterijai** – antrinis navikas, pirminio naviko atsikartojimas, prieš operaciją taikyta chemoterapija ar kitoks gydymas.



3 pav. Tiriamųjų pacienčių atrankos schema

Kaip jau buvo minėta, tiriamąją grupę sudarė 203 pacientės, sergančios ankstyvųjų stadijų (T1N0, T1N1, T2N0, T2N1) krūties duktalinė karcinoma ir 2007–2009 metais gydytos VUOI klinikoje. Vidutinis pacienčių amžius –56 metai ( $\pm 12,9$ ), jauniausia pacientė 27 metų, vyriausia – 87 metų (4 pav.).



Pagal medianą pacientės suskirstytos į dvi amžiaus grupes (27–55 m., 56–87 m.). Tiriamosios grupės pacienčių pasiskirstymas pagal amžiaus grupes, TNM klasifikaciją ir diferenciacijos laipsnį pateiktas 3 lentelėje. T1 ir T2 grupes sudarė panašus pacienčių skaičius: atitinkamai 107 (52,7%) ir 96 (47,3%). Pagal sritinių limfmazgių pažeidimo metastazėmis laipsnį pusė pacienčių sudarė grupę be pažeidimų – N0 – 104 (52,5%), kita pusė – su pažeidimais: N1 – 64 (32,3%), N2 – 21 (10,6%) ir N3 – 9 (4,6%) asmenys. Pagal naviko diferenciacijos laipsnį daugumai pacienčių nustatyta vidutinė (G2) ar bloga (G3) naviko diferenciacija (atitinkamai 38,9% ir 41,4%).

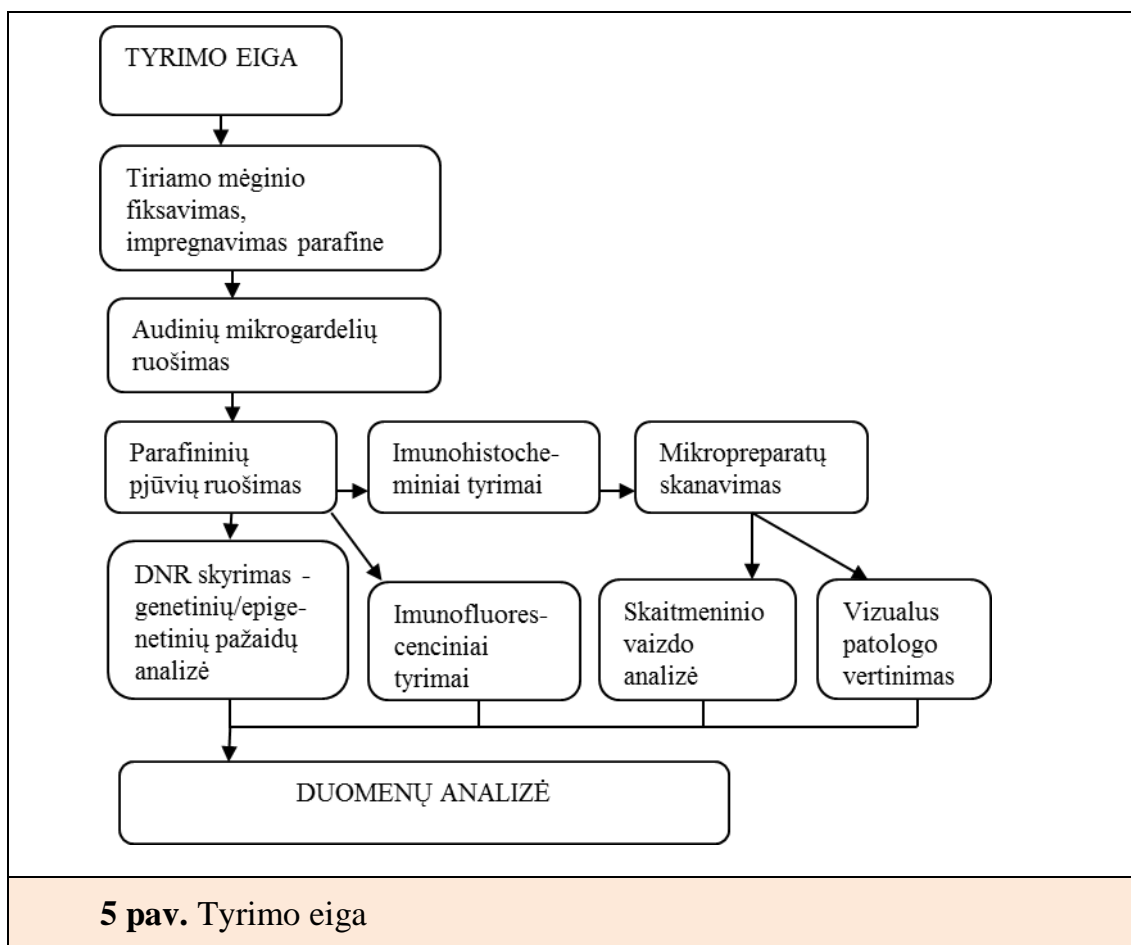
**3 lentelė.** Tirtųjų pacienčių pasiskirstymas pagal amžių, TNM klasifikaciją ir naviko diferenciacijos laipsnį

Amžiaus grupė	Dažnis	Procentas
1 (27-55 m.)	100	49,3
2 (56-87 m.)	103	50,7
<b>T</b>		
1	107	52,7
2	96	47,3
<b>N</b>		
0	104	52,5
1	64	32,3
2	21	10,6
3	9	4,6
<b>M</b>		
0	203	100
<b>G</b>		
1	40	19,7
2	79	38,9
3	84	41,4

T – pirminis navikas (T1 – navikas  $\leq 2$  cm, T2 - navikas  $> 2$  cm,  $< 5$  cm); N – regioninės metastazės (N0 – regioniniai limfmazgiai nepažeisti, N1 - metastazės 1-3 regioniniuose limfmazgiuose, N2 - metastazės 4-9 regioniniuose limfmazgiuose, N3 - metastazės 10 ir daugiau regioninių limfmazgių); M – atokiosios metastazės (M0 – atokiųjų metastazių nėra); G – naviko diferenciacijos laipsnis (G1 – gerai diferencijuotas, G2 – vidutiniškai diferencijuotas, G3 – blogai diferencijuotas).

### Tyrimo eiga

1. Pacienčių atranka (VUOI diagnozavus pirminę duktalinę krūties karcinomą).
2. Mėginių atranka (Valstybiniame patologijos centre (VPC) įvertinus esamą naviko dydį, histologiją).
3. Atrinktų mėginių šaldymas, fiksavimas, impregnavimas parafinu.
4. Audinių mikrogardelių (TMA) ruošimas.
5. IHC, FISH reakcijų atlikimas.
6. IHC mikropreparatų skenavimas.
7. Skenuotų vaizdų vizualus patologo vertinimas.
8. Skenuotų vaizdų skaitmeninio vaizdo analizė.
9. Naviko DNR išskyrimas. Genetinių ir epigenetinių pažeidimų analizė.
10. Sukauptų duomenų analizė statistiniais tyrimo metodais (5 pav.).



## 3.2. Tyrimo metodai

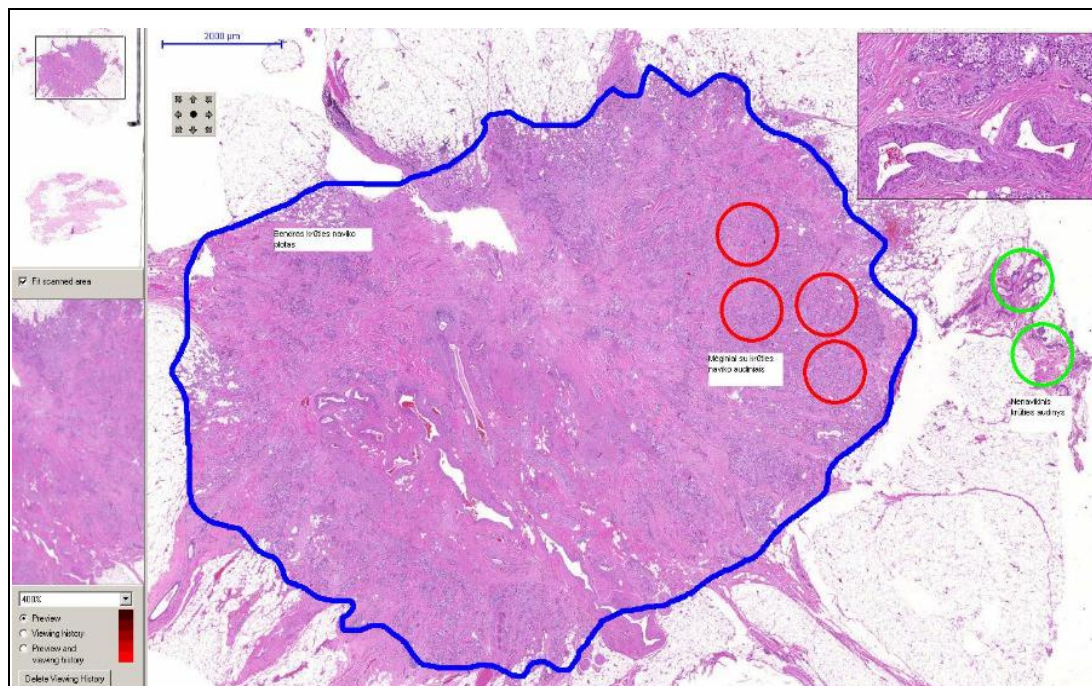
### 3.2.1. Mėginių paruošimas

Naviko mėginiai atrinkti iš 203 pacienčių, VUOI diagnozavus ir VPC morfologiškai patvirtinus ankstyvąją, t.y. I–II stadijos (T1N0, T1N1, T2N0, T2N1) krūties duktalinę karcinomą. Mėginiai rinkti 2006–2009 metų laikotarpiu.

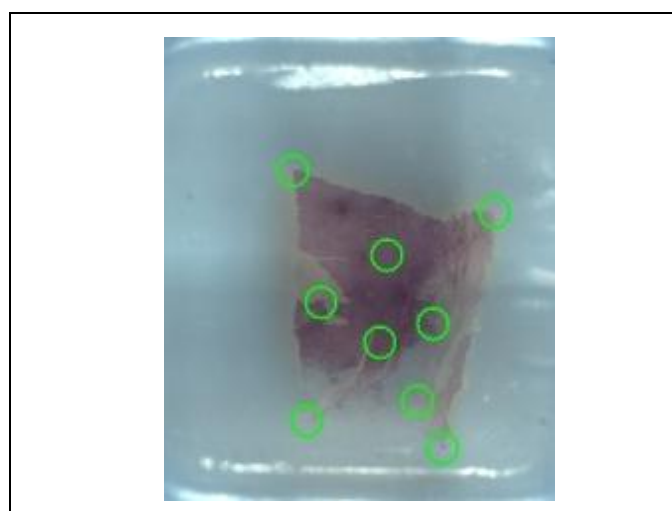
Audinių mikrogardelės ruoštos iš 10 procentų buferinio formalino tirpale fiksuotų, parafinu impregnuotų audinių blokų. Audinių blokus mikrogardelėms atrinko gydytojas patologas, vertindamas hematoksilinu ir eozinu (H/E) dažytus audinių pjūvius. Atrinktų mėginių H/E mikropreparatai skenuoti 20x padidinti *Aperio Scan Scope GL*, skeneriu (*Aperio Technologies, Vista, CA, JAV*). Skenuotame viso pjūvio audinio vaizde patologas pažymėjo navikinio audinio vietas (6 pav). Žymėti vaizdai konvertuoti į *Mirax MViewMRXS*



formatą, kuris naudotas konstruojant audinių mikrogardeles pusiau automatiniu audinių mikrogardelių ruošimo aparatu (*3DHISTECH, TMA Master*, Budapeštas, Vengrija). Iš žymėtų naviko zonų imti šeši 1 mm diametro mėginiai: 4 – TMA IHC analizei, 2 – genetiniams ir epigenetiniams tyrimams (7 pav.).



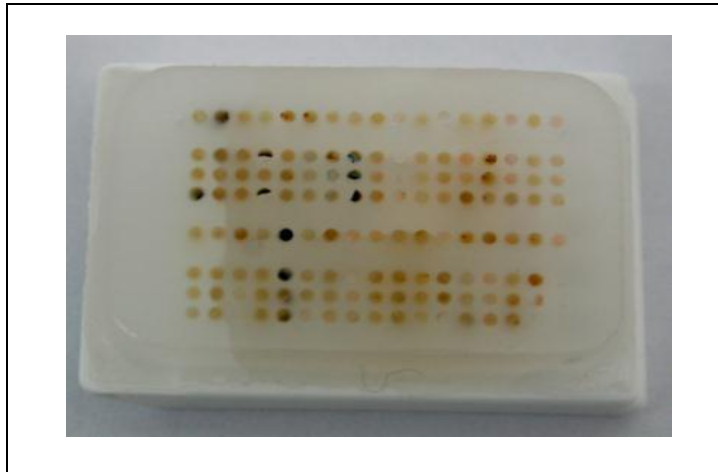
**6 pav.** Hematoksilino-eozino histocheminiu metodu dažyto mikropreparato skenuotas vaizdas, padidintas 20 x  
Raudona spalva pažymėtos navikinio audinio zonos, iš kurių paimti mėginiai tyrimui



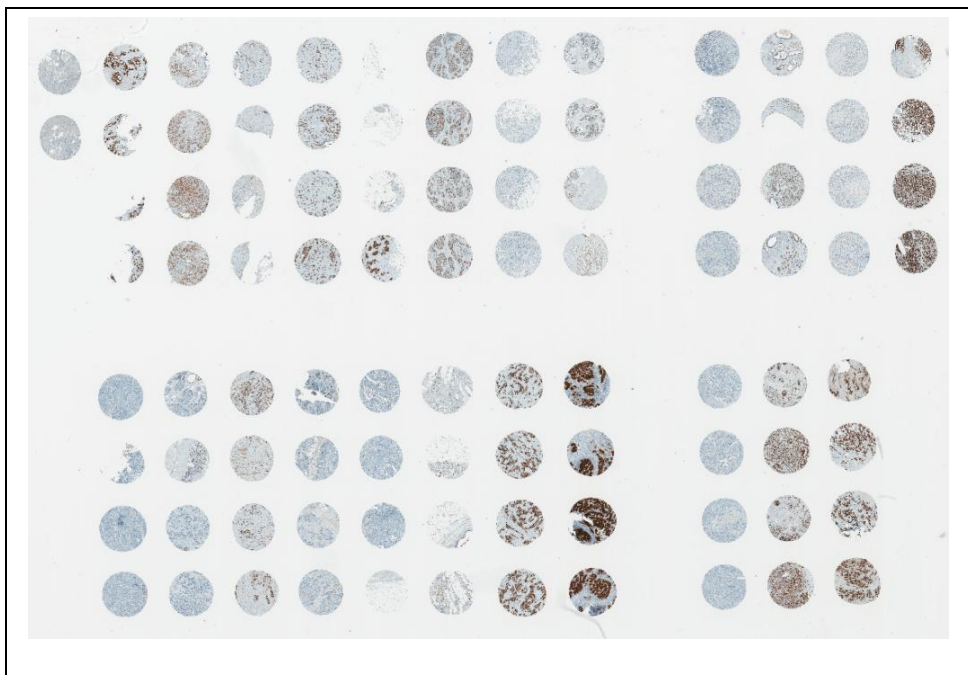
**7 pav.** Žymėtas parafino blokas audinių mikrogardelių ruošimo automatu  
Iš pažymėtų vietų konstruojant audinių mikrogardeles imti tiriamieji naviko mėginiai

Iš 203 pacienčių mėginių paruošta 16 audinių mikrogardelių, kuriose sudėti 812 tiriamieji naviko mėginiai. Tyrimui imti 6 kiekvienos pacientės naviko mėginiai (8 pav.).

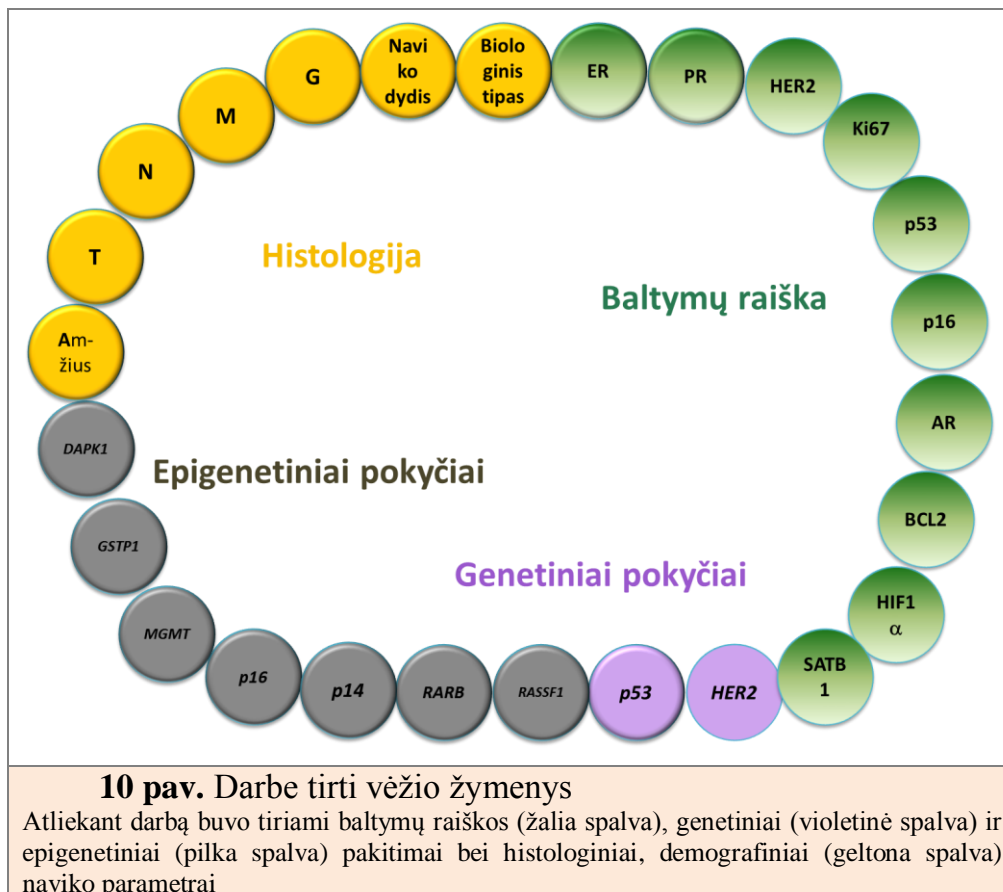
IHC analizei atlikti pjauti 3 mikronų storio pjūviai (9 pav.), FISH tyrimams – 4 mikronų storio pjūviai. 105 pacienčių 1 mm išgręžti navikinio audinio fragmentai atrinkti genetinei ir epigenetinei analizei. Darbe analizuoti žymenys pateikti 10 paveiksle.



**8 pav.** Vienas audinių mikrogardelės blokas, kuriame sudėti 34 pacienčių 136 (34×4) tiriamieji naviko mėginiai



**9 pav.** Audinių mikrogardelės pjūvis  
Atlikta imunohistocheminė reakcija prieš žmogaus estrogenų receptorius



### 3.2.2. Imunohistocheminiai tyrimai

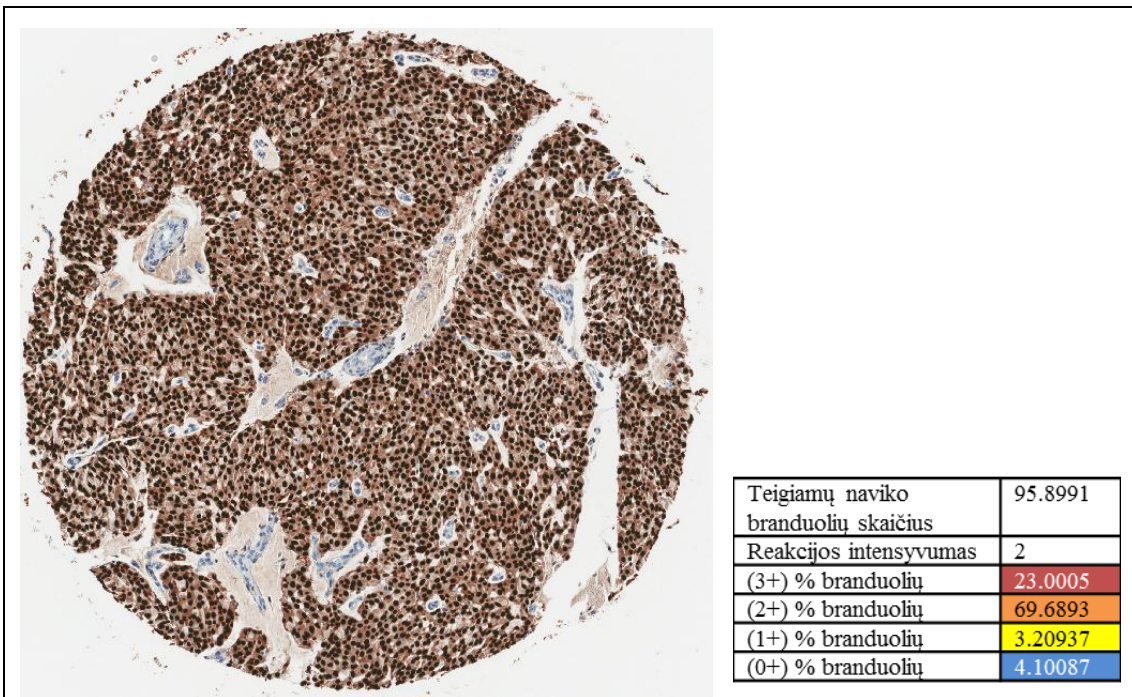
Darbe tirtų biologinių žymenų baltymų raiška parafininiuose pjūviuose analizuota IHC tyrimo metodu naudojant *Ventana BenchMark XT* dažymo automatą (*Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, JAV*). Parafininiai pjūviai po deparafinavimo ksilenu ir dehidratavimo etilo alkoholiu perkelti į *Ventanos* plovimo tirpalą. Antigenų epitopams atstatyti naudotas *Ventanos* ląstelių kondicionavimo tirpalas (pH 8,5) – 100°C 36 min. Vėliau pjūviai inkubuoti monokloniniais antikūnais – 37°C 16 min., naudojant *Ventana Ultraview DAB* detekcijos sistemą. Naudoti šie antikūnai (Ak): *Ventana* triušio monokloninis Ak prieš HER2, klonas – 4B5, *Ventana* pelės monokloninis Ak prieš ER, klonas – SP1, *Ventana* pelės monokloninis Ak prieš PR, klonas – 1E2, *Spring* triušio monokloninis Ak prieš AR, klonas – SP107, *DAKO* pelės monokloninis Ak prieš Ki67, klonas – MIB-1, *Novocastra* pelės monokloninis Ak prieš p53, klonas – DO-7, *CINtec* pelės monokloninis

Ak prieš p16, klonas – E6H4, *DAKO* pelės monokloninis Ak prieš BCL2 onkoproteiną, klonas – 124, *Epitomics* triušio monokloninis Ak prieš SATB1, klonas – EPR3895 ir *Epitomics* triušio monokloninis Ak prieš HIF1 $\alpha$ , klonas – EP1215Y (4 lentelė). IHC reakcijos pabaigoje pjūviai kontrastuoti *Mayer's* hematoksilinu, uždėti dengiamaisiais stikleliais. Teigiamai IHC testo kontrolei naudoti viso pjūvio krūties naviko mėginiai, neigiama kontrolė atlikta tuose pačiuose pjūviuose, praleidus IHC reakcijoje vykdomo pirminio antikūno uždėjimo etapą. Skaitmeniniai vaizdai skenuoti *Aperio ScanScope GL* objektinių stiklelių skeneriu (*Aperio Technologies, Vista, CA, JAV*) 20x padidiniu (11–16 pav.).

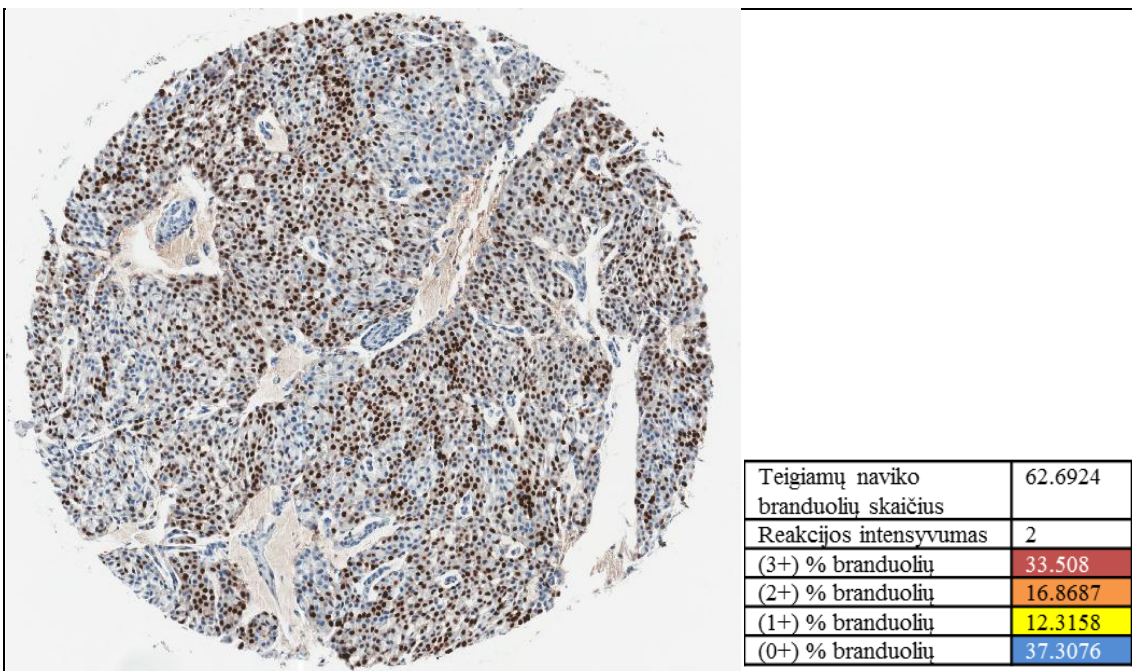
**4 lentelė.** Imunohistocheminiam tyrimui naudoti antikūnai

Antikūnas	Gamintojas	Klonas	Skiedimo santykis
ER	<i>Ventana</i>	SP1	<i>RTU</i>
PR	<i>Ventana</i>	1E2	<i>RTU</i>
HER2	<i>Ventana</i>	4B5	<i>RTU</i>
AR	<i>Spring</i>	SP107	1:100
Ki67	<i>Dako</i>	MIB-1	1:200
p53	<i>Novocastra</i>	DO-7	1:25
p16	<i>CINtec</i>	E6H4	<i>RTU</i>
BCL2	<i>Dako</i>	124	1:50
SATB1	<i>Epitomics</i>	EPR3895	1:75
HIF1 $\alpha$	<i>Epitomics</i>	EP1215Y	1500

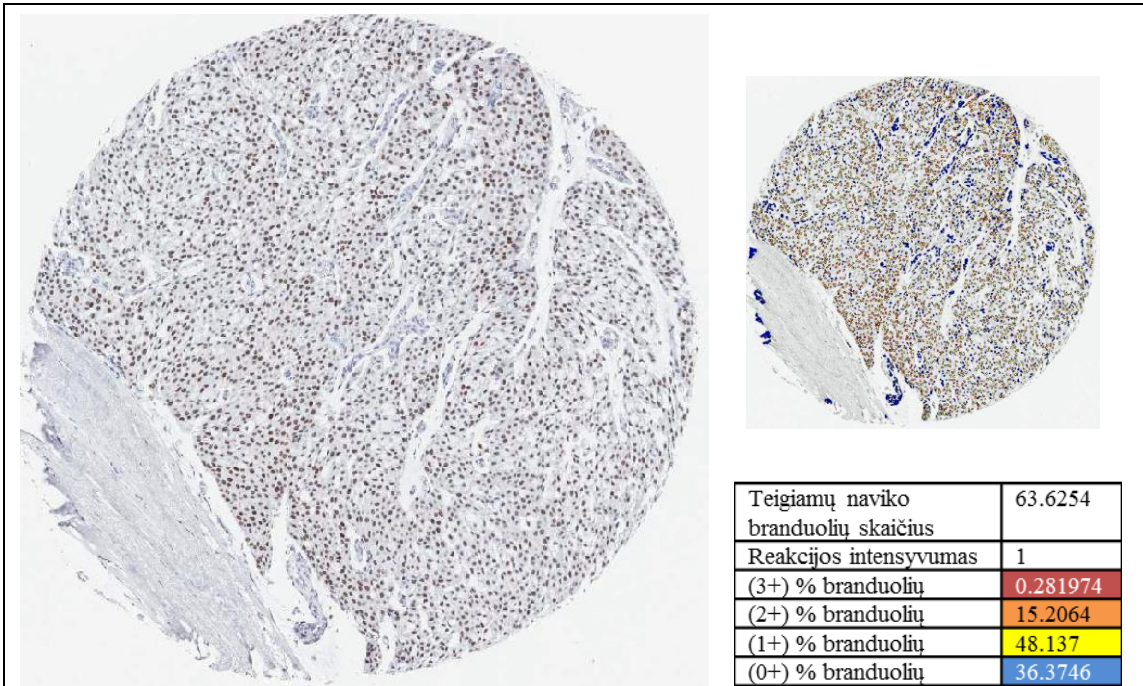
ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53, p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys, *RTU* – angl. paruoštas naudoti.



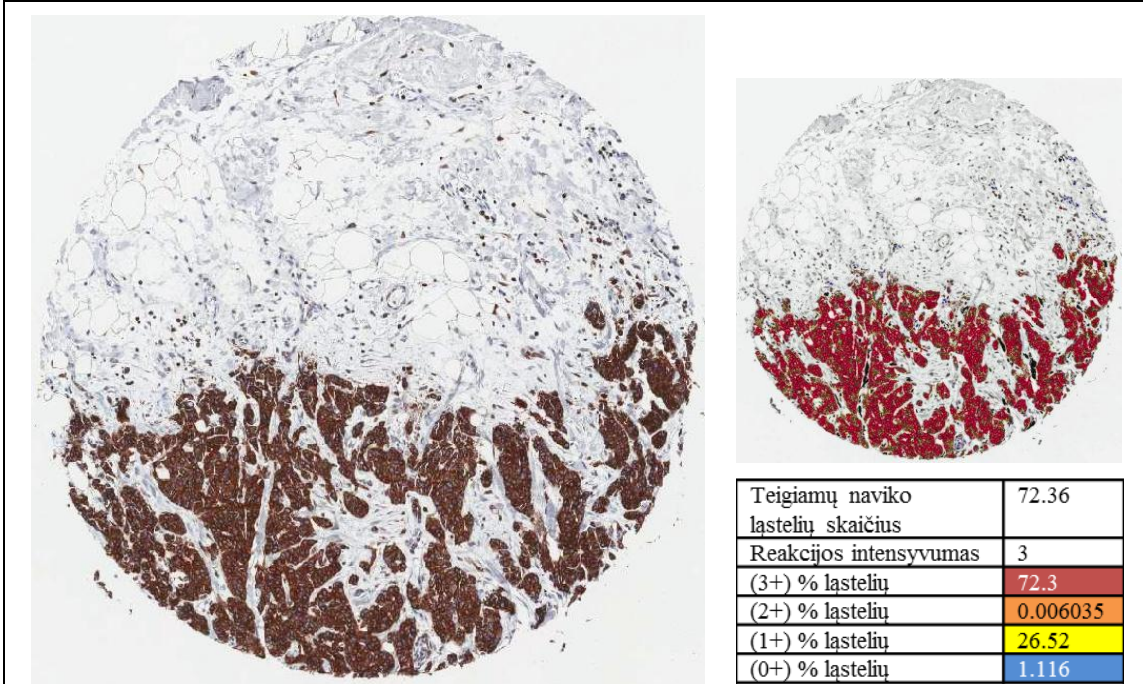
**11 pav.** Imunohistocheminė reakcija estrogenų receptoriams nustatyti  
Baltymo raiška skaitmeninės analizės būdu įvertinta – ++



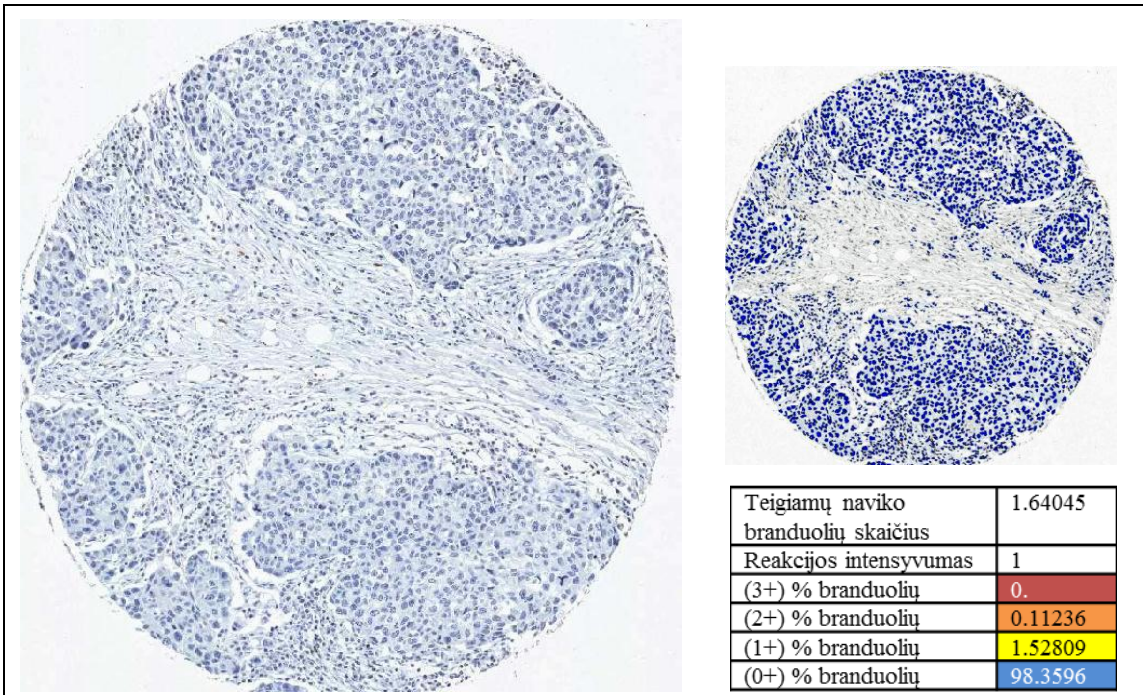
**12 pav.** Imunohistocheminė reakcija progesteronų receptoriams nustatyti  
Baltymo raiška skaitmeninės analizės būdu įvertinta – ++



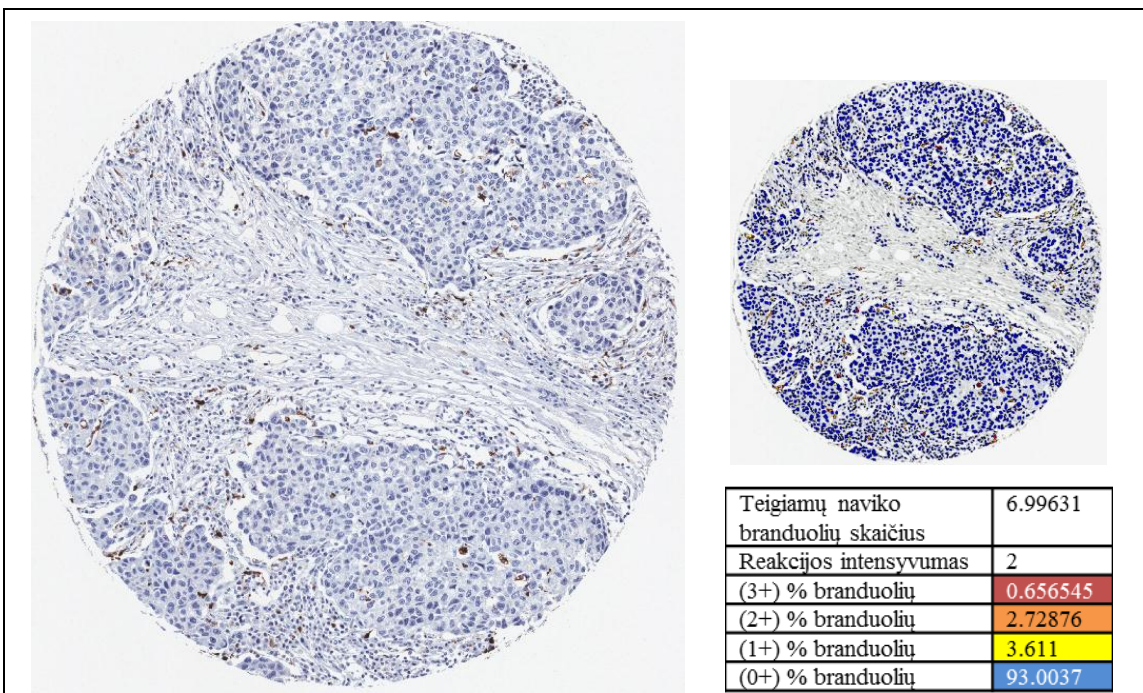
**13 pav.** Imunohistocheminė reakcija androgenų receptoriams nustatyti  
Baltymo raiška skaitmeninės analizės būdu įvertinta – +



**14 pav.** Imunohistocheminė reakcija apoptozės slopinančiam baltymui BCL2 nustatyti. Baltymo raiška skaitmeninės analizės būdu įvertinta – +++



**15 pav.** Imunohistocheminė reakcija transkripcijos veiksnio baltymui SATB1 nustatyti. Baltymo raiška skaitmeninės analizės būdu įvertinta – +



**16 pav.** Imunohistocheminė reakcija atsakui į hipoksiją kontroliuojantį baltymą HIF1 $\alpha$  nustatyti. Baltymo raiška skaitmeninės analizės būdu įvertinta – ++

### 3.2.3. Vizualus patologo vertinimas

Vizualus patologo IHC baltymų raiškos vertinimas atliktas skenuotame vaizde kompiuterio monitoriuje (*Acer AL2616W*). Patologas kiekvieną audinių mikrogardelės mėginį vertino individualiai. Nepakankamos kokybės mėginiai (suardyta audinio struktūra, išlikęs nepakankamas mėginio kiekis, nekokybiška IHC reakcija) toliau neanalizuoti. Toliau neanalizuoti ir tie mėginiai, kuriuose nustatytas dultalinės *in situ* karcinomos komponentas.

IHC reakcijų rezultatus gydytojas patologas vertino atsižvelgdamas į *ASCO/CAP* bei *FDA* Maisto ir vaistų administracijos (angl. *Food and Drug Administration*) patvirtintas gaires. Biologinių žymenų IHC raiška vertinta pagal skalę nuo 0 iki 3 (0, 1+, 2+ ar 3+). 0 ir 1+ neigiamos žymenų raiškos kategorijos sujungtos į vieną neigiamos raiškos navikų grupę (0/1+).

HER2 IHC teigiama raiška (3+) konstatuota, kai matoma >10 procentų invazinio naviko ląstelių intensyviai, nepertraukiamai nusidažiusi ląstelės membrana arba nustatyta HER2 geno amplifikacija FISH tyrimo metodu (nustatytas HER2 ir SEP17 santykis >2 ar HER2 geno kopijų skaičiaus vidurkis ląstelės branduolyje >6). Ribinė HER2 geno vertė (2+) navike konstatuota, kai HER2 IHC nustatyta raiška yra 2+ arba geno amplifikacija FISH tyrimo metodu yra 1,8–2,0 ar geno kopijų skaičiaus vidurkis ląstelės branduolyje yra nuo 4 iki 6 signalų. HER2 neigiamos raiškos navikas konstatuotas, kai HER2 IHC nustatyta raiška – 0/1+ arba FISH tyrimo metodu nenustatyta geno amplifikacijos (nustatytas HER2 ir SEP17 santykis < 1,8 ar HER2 geno kopijų skaičiaus vidurkis ląstelės branduolyje < 4).

Kitų žymenų teigiama baltymų raiška vertinta, atsižvelgiant į nustatytą baltymą ekspresuojančių naviko ląstelių skaičiaus tiriamajame audinyje slenkstinę vertę: ER, PR, HIF1 $\alpha$  ir SATB1 >10%, Ki67 ir p16 >14%, AR ir BCL2 >30%, p53 >5%.

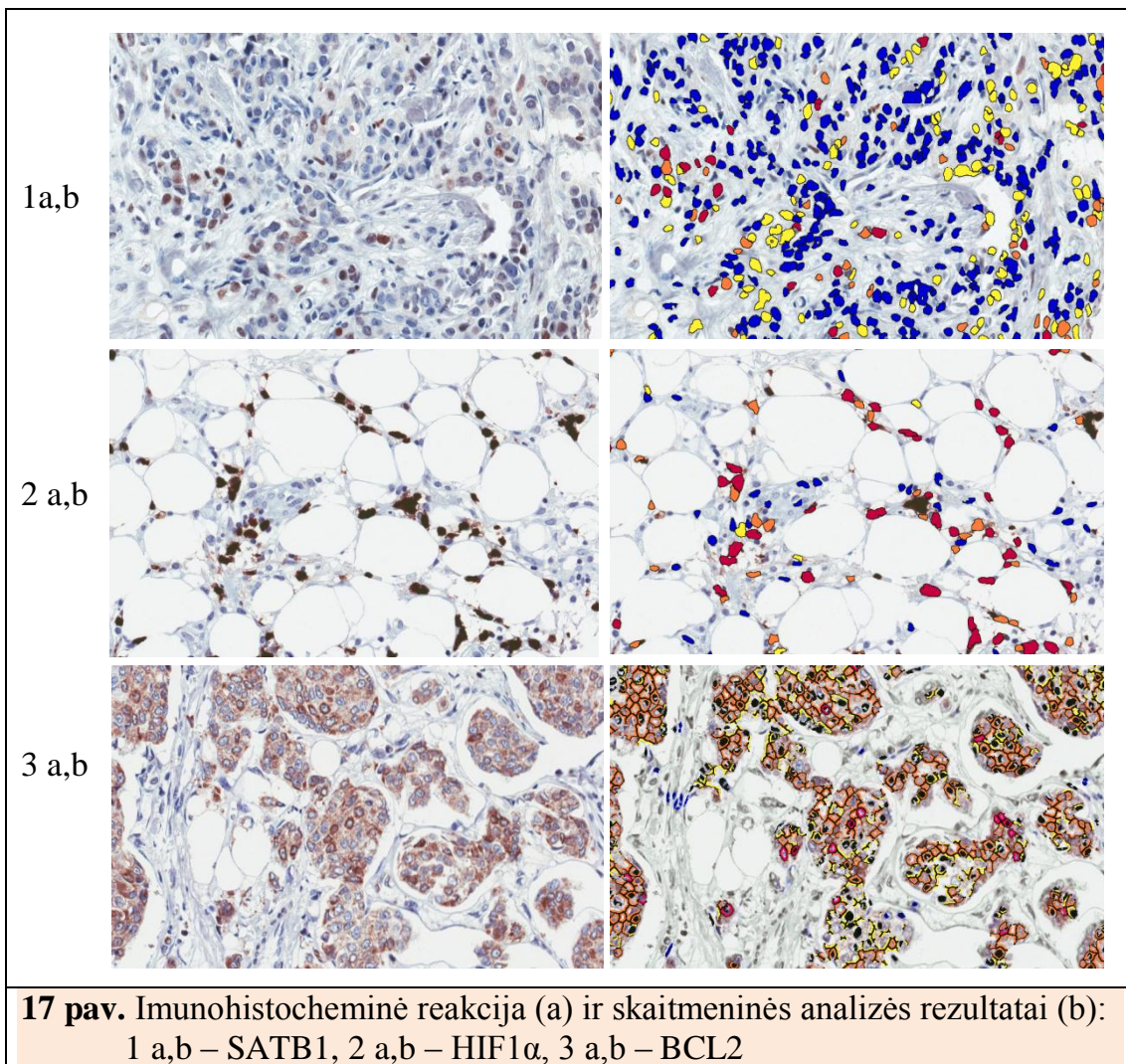


### 3.2.4. Skaitmeninė vaizdų analizė

Skaitmeninė vaizdų analizė atlikta naudojant tuos pačius audinių mikrogardelių vaizdus, kuriuos vertino gydytojas patologas.

Skaitmeninės analizės objektyvumas priklauso nuo daugelio veiksnių [34]. Vienas esminių reikalavimų – tiksliai atskirti tiriamo audinio navikines struktūras. Jei skaitmeninė analizė atliekama ne tik navikiniame audinyje, bet ir kitose jį supančiuose struktūrose (stromoje, leukocituose, duktalinėje *in situ* karcinomoje), analizės rezultatai „praskiedžia“ analizuojamo žymens raiškos procentą naviko ląstelėse. Savo darbe mes naudojome vieną iš pirmaujančių mikroskopinio vaizdo skaitmeninės analizės platformų – *AperioGenie*. Šią sistemą „apmokėme“ tiksliai atpažinti skirtingus krūties vėžio audinius sukurdami audinių atpažinimo klasifikatorių. Toks automatizuotas audinio atpažinimas ne tik paspartina analizės procesą, bet ir pašalina žmogaus tyrėjo įtaką analizės rezultatams.

Tolesnei analizei naudoti skaitmeninės analizės parametrai: tolygaus membraninio naviko ląstelių nusidažymo (HER2 ir BCL2) ir naviko ląstelių branduolių (ER, PR, AR, Ki67, p53, p16, SATB1 ir HIF1 $\alpha$ ) nusidažymo procentai. IHC ir skaitmeninės analizės (SA) rezultatai parodyti 17 pav.

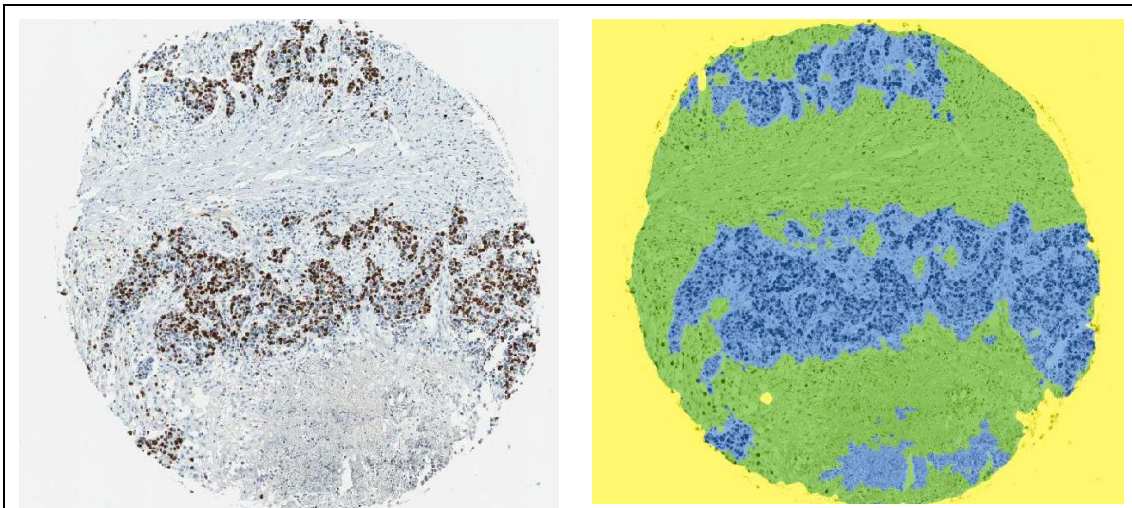


**17 pav.** Imunohistocheminė reakcija (a) ir skaitmeninės analizės rezultatai (b):  
1 a,b – SATB1, 2 a,b – HIF1 $\alpha$ , 3 a,b – BCL2

SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas

Susumuoti kiekvienos pacientės atskirai gauti audinių mikrogardelių analizės duomenys (susumautos visos ir teigiamos konkrečiam IHC žymeniui naviko ląstelės, apskaičiuotas teigiamų naviko ląstelių procentas). Pacientės, kurių mėginiuose suskaičiuota <500 naviko ląstelių, į tolesnę analizę neįtrauktos. Tolesnei visų 10 IHC žymenų skaitmeninei analizei atlikti atrinkti 109 pacienčių mėginiai, tenkinę nustatytus tiriamajam mėginiui reikalavimus.

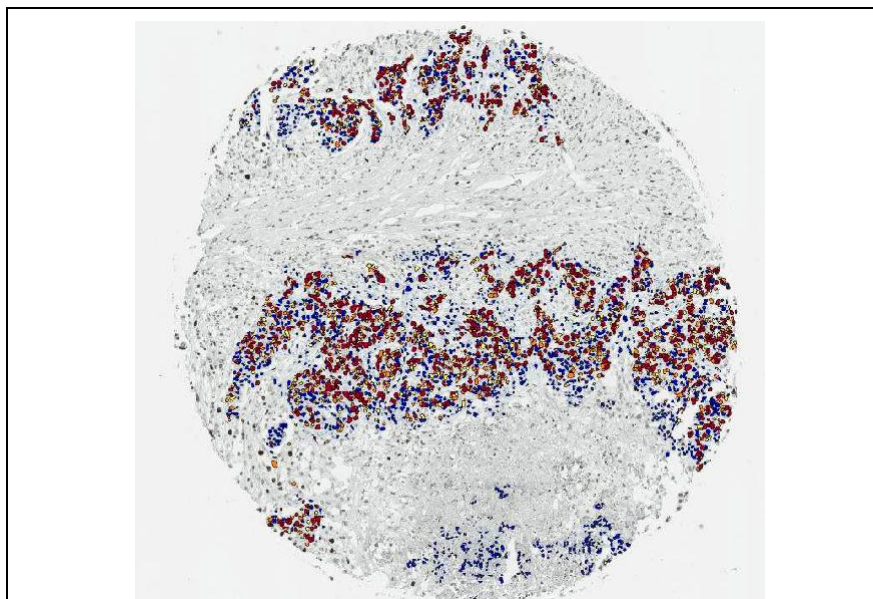
Sukurto skaitmeninės analizės klasifikatoriaus tikslumas – 98,7 procentų, jautrumas – 98,1 procentų ir specifiškumas – 99,3 procentų (18 pav.).



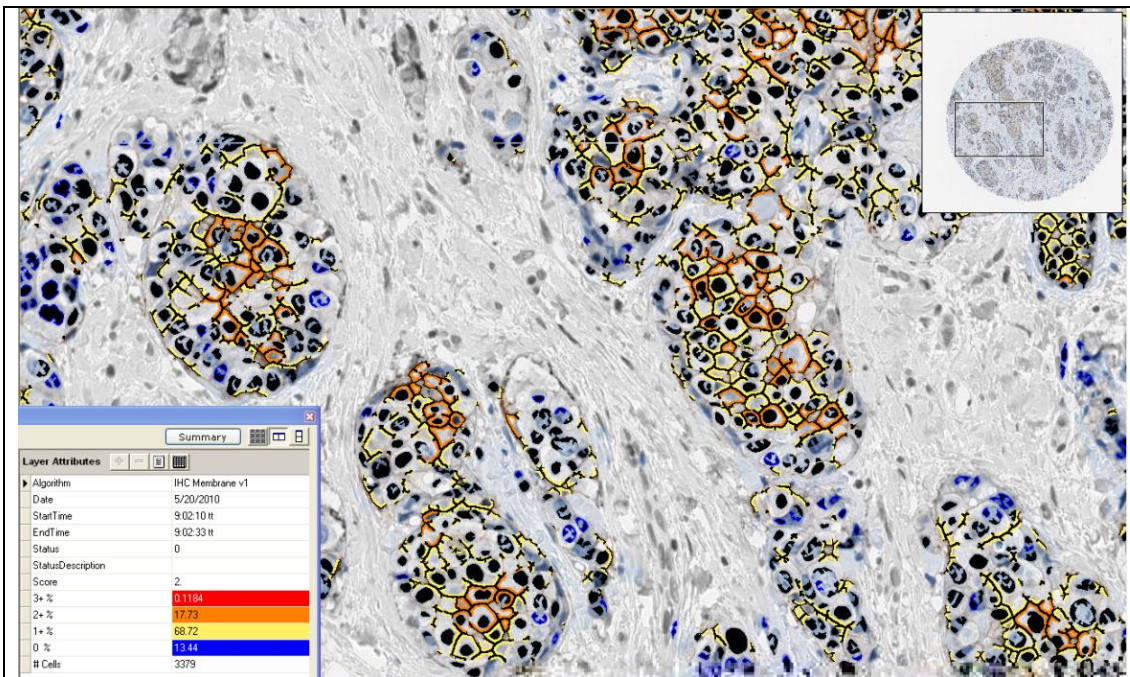
**18 pav.** Sukurto *AperioGenie* klasifikatoriaus rezultatai

Klasifikatorius atskiria skirtingas audinio struktūras: mėlyna spalva pažymėtas navikinis audinys, žalia – stroma, geltona – stiklas

Sukurtas klasifikatorius naudotas kartu su branduoline *Nuclear v9* ir membranine *Membrane v9 Aperio* analizėmis. Analizuoti pasirinktas tik navikinio audinio komponentas. Skaitmeninis algoritmas nurodo, koku intensyvumu ekspresuojamas tiriamasis žymuo (silpnu, vidutiniu ar stipriu) bei suskaičiuoja, kiek ląstelių ekspresuoja analizuojamą baltymą (19, 20 pav.).



**19 pav.** Skaitmeninė imunohistocheminio Ki67 branduolinio žymens tyrimo analizė



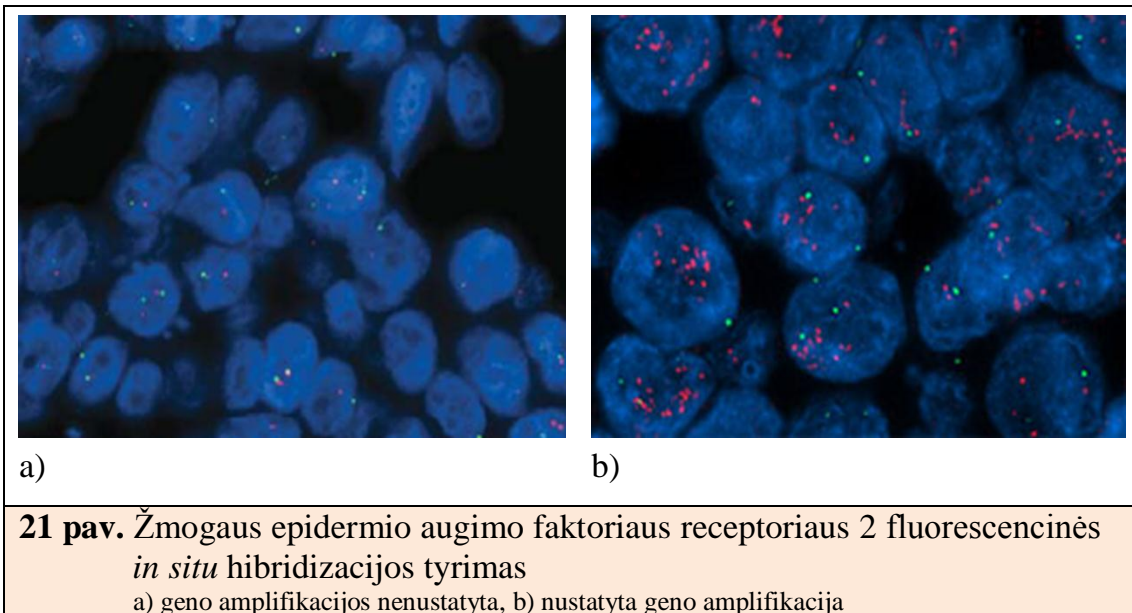
**20 pav.** Skaitmeninė imunohistocheminio membraninio žymens – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2, tyrimo analizė  
Raudona spalva pažymėtos intensyviai baltymą ekspresuojančios naviko ląstelės (HER2 3+), oranžine spalva – paribinės ekspresijos ląstelės (HER2 2+), geltona spalva – silpnos ekspresijos ląstelės (HER2 1+). Mėlyna spalva pažymėtos HER2 baltymo neekspresuojančios ląstelės (HER2 0).

### 3.2.5. Imunofluorescenciniai tyrimai

HER2 geno amplifikacija buvo nustatyta dviejų zondų *PathVysion* HER2 FISH rinkiniu (*Abbott-Vysis, Inc., Downers Grove, IL, JAV*). 4  $\mu\text{m}$  parafinu impregnuoti mėginių pjūviai perkelti ant objektinių stiklelių, turinčių elektrostatinę krūvį, inkubuoti per naktį 56°C temperatūroje. Vėliau pjūviai deparafinuoti ksilene, dehidratuoti etilo alkoholiu ir džiovinti ore. Tolesnio reakcijos etapo metu po pjūvių paruošimo naudojant 0,2N HCl tirpalą 20 min. ir specialų *Path Vysion* 80°C tirpalą 30 min., mėginiai buvo apdorojami proteazės 37°C tirpalu 26 min. Hibridizavimo tirpalas, sudarytas iš tiesiogiai žymėtų dviejų žymių – *SpectrumGreen*, 17 chromosomos centromeros (CEP17) ir *SpectrumOrange* – HER2 geno lokusui žymėti buvo užlašintas ant tiriamųjų mėginių. Tolesnio reakcijos etapo metu mėginių pjūviai denatūruoti hibridizatoriuje (*DAKO Diagnostics, Glostrupas, Danija*) 5 min. 72°C temperatūroje ir hibridizuoti 19 val. 37°C temperatūroje. Neprisijungę žymens fragmentai du kartus plauti karštu 72°C SSC ir 0,3% NP-40 tirpalų mišiniu 2

min. Branduoliai kontrastuoti DAPI tirpalu, mėginių pjūviai uždengti dengiamąja medžiaga (*Invitrogen Corporation, Carlsbadas, JAV*). Kartu su tiriamaisiais mėginiais buvo tiriami ir kontroliniai amplifikuoti bei neamplifikuoti mėginiai. Tyrimo rezultatai vertinti fluorescenciniu *Zeiss* mikroskopu (*Zeiss, Axio Imager.Z2, Gottingenas, Vokietija*). Mikroskopavimui naudoti atskiri – žalias, oranžinis ir trigubas – *Dapi-FITC-Cy3* filtrai.

FISH analizė buvo atlikta tyrėjui nežinant IHC tyrimo rezultatų bei vadovaujantis *FDA* vertinimo schemomis (8.2.3. skyrius, 21 pav.).



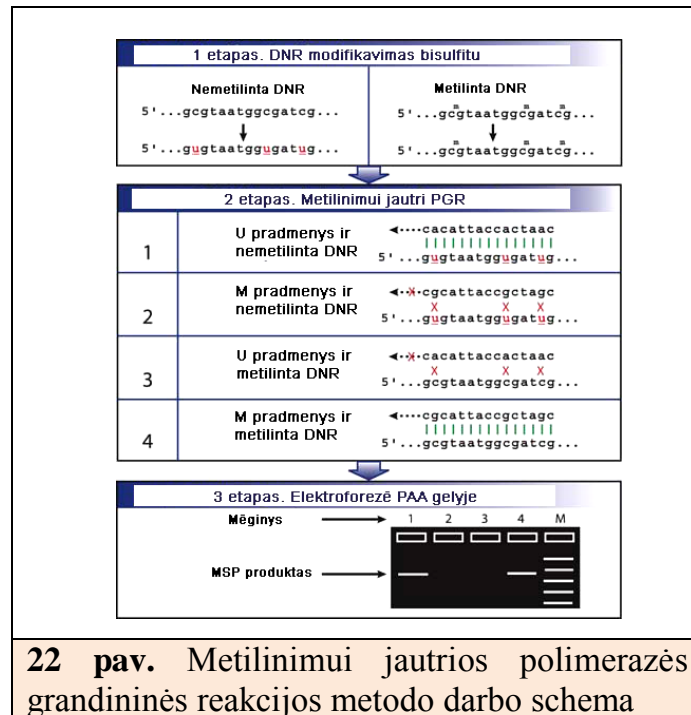
### 3.2.6. DNR išskyrimas, metilinimo ir geno mutacijų tyrimai

Šaldytų ir parafininių audinių DNR buvo išskiriama naudojant organinį (fenolio-chloroformo) metodą. Parafininiai audiniai (1 mm diametro stulpeliai) dėti į 1,5 ml mėgintuvėlį. Parafinas pašalintas įpylus 1 ml ksilolo (*Roth*). Mėginiai supurtyti ir inkubuoti 10 min. 55 °C temperatūroje termopurtyklėje. Po to mėginiai centrifuguoti 10 min. 13000 rpm jėga, supernatantas pašalintas. Šis etapas kartotas. Ksilolas iš mėginių pašalintas įpylus 1 ml 96% etanolio, mėginiai inkubuoti 10 min. 55 °C temperatūroje termopurtyklėje. Vėliau

centrifuguota 10 min. 13000 rpm jėga, supernatantas pašalintas. Poveikis etanoliumi kartotas. Etanolio likutis išgarintas atvirus mėgintuvėlius laikant 37 °C temperatūroje.

Į mėgintuvėlį su audinių pjūviais įpilta 500 µl lizės buferinio tirpalo (50 mM Tris-HCl, *Roth*), pH 8,5, 1 mM EDTA (*Roth*) ir 0,5% Tween-20 (*Roth*), sumaišyta ir inkubuota 1 val. 55 °C temperatūroje. Po to įpilta 25 µl proteinazės K (20 mg/ml, *Fermentas*) ir palikta per naktį purtyklėje 55 °C temperatūroje. Vėliau įpilta 500 µl fenolio/chloroformo/izoamilalkoholio (25:24:1, *Roth*), mėginiai purtyti 10 min., centrifuguoti 10 min. 13500 rpm jėga. Supernatantas perpiltas į naują 2 ml mėgintuvėlį, etapas su fenolio/chloroformo/izoamilalkoholio mišiniu pakartotas. Fenolio ir izoamilalkoholio likučiai pašalinti į supernatantą įpylus 500 µl chloroformo (*Roth*). Mėginiai purtyti 10 min. ir centrifuguoti 10 min. 13500 rpm jėga. Supernatantas surinktas ir perpiltas į naują mėgintuvėlį. DNR nusodinta veikiant 40 µl 5 M amonio acetato (*Fluca*) ir 1 ml šalto (-20 °C) 96% etanolio. DNR laikoma 2–3 val. -20 °C temperatūroje. Centrifuguojama 15 min. 13500 rpm jėga +4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalintas, o DNR perplauta šaltu 70% etanoliumi ir centrifuguota 15 min. 13500 rpm jėga +4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalintas. Mėgintuvėlis paliktas atviras 37 °C temperatūroje, kol išgaravo etanolio likučiai. DNR ištirpinta 20 µl benukleaziniame vandenyje ir laikyta -20 °C.

Atlikti epigenetinei analizei naudota viena jautriausių technologijų – metilinizimui jautri PGR arba MSP. Prieš analizę DNR seka modifikuota: veikiant natrio bisulfitu, nemetilintas citozinas virsta uracilu, o PGR metu atpažįstamas kaip timinas; metilcitozinas yra nejautrus bisulfitui ir PGR metu atpažįstamas kaip citozinas. Ši reakcija dar vadinama bisulfitiniu virsmu, jos metu epigenetinė DNR modifikacija paverčiama genetiniu pokyčiu. Principinė MSP schema pateikiama 22 pav.



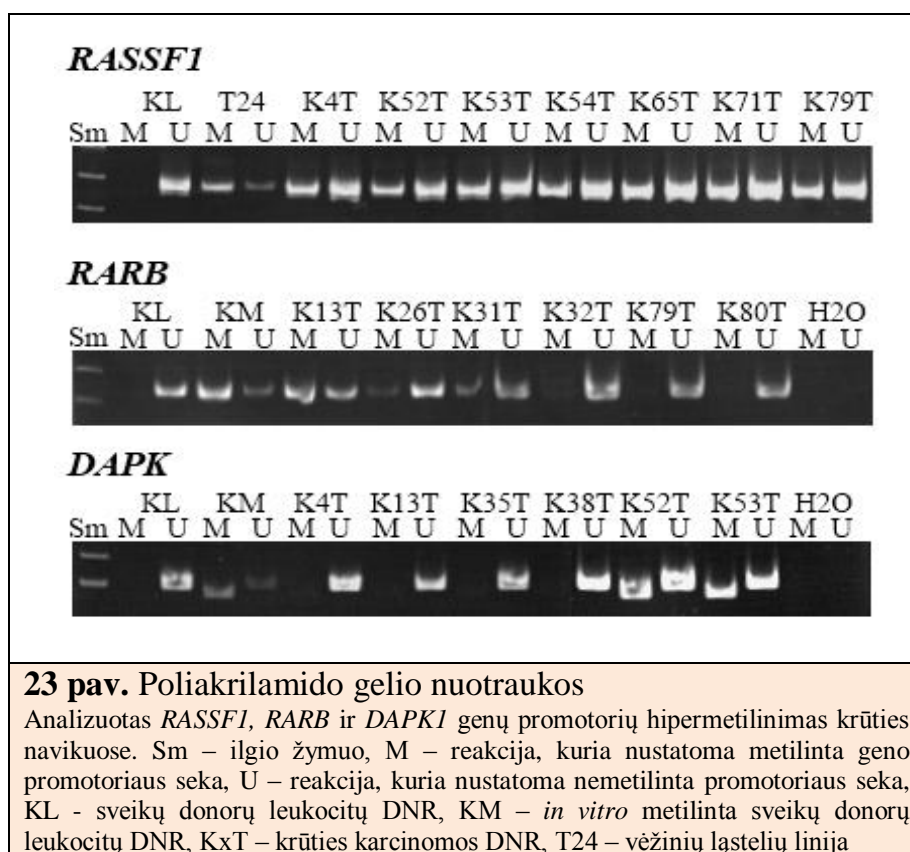
**22 pav.** Metilimui jautrios polimerazės grandininės reakcijos metodo darbo schema

Audinių DNR modifikuoti 1 µg DNR 15 min. denatūruojamas 37°C temperatūroje su 3 M NaOH (*Sigma*). Vėliau DNR 16 val. 50°C temperatūroje veikiama natrio metabisulfitu (2,3 M 5pH, *Sigma*) kartu su hidrochinonu (10 mM, *Fluka*). Iš modifikuotos DNR išvalomos druskos naudojant DNR valymo kolonėles *Wizard DNA Clean-up System* (*Promega*). Galutinei DNR modifikacijai gauti DNR su 3 M NaOH inkubuojama 15 min. 37°C temperatūroje. Tirpalas neutralizuojamas 10 M amonio acetatu, DNR nusodinama etanoliu. Paruošta DNR tirpinama benukleaziniame vandenyje ir laikoma šaldytuve –20°C temperatūroje.

Metilimui jautri PGR (MSP) vykdoma naudojant pradmenų poras, atrankiai sąveikaujančias su metilinta (M reakcija) ir nemetilinta (U reakcija) DNR seka geno promotoriuje. Dauguma MSP pradmenų pagausina CpG salas, esančias tiriamų genų promotoriuje arba 1–ame egzone.

PGR reakcija vykdoma 25 µl reakcijos mišinio, kurio sudėtis: 1–2 µl modifikuotos DNR, 1 x PGR buferio (*Applied Biosystems*), 0,4 mmol/L dNTP (*Fermentas*), 2,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (*Applied Biosystems*), 1% dimetilsulfoksido (*Fluka*), reikalingas pradmenų kiekis (galutinė koncentracija – 6 ng/µl) ir 1,25 vnt. *AmpliTaq Gold* polimerazės (*Applied Biosystems*). PGR vykdoma

termocikleryje (*Mastercycler Eppgradient S, Eppendorf*) naudojant šį temperatūrinį režimą: 95 °C – 10 min., 35-37 ciklai: 95 °C – 45 sek., pradmenų jungimosi temperatūra – 45 sek., 72°C – 45 sek. ir 72°C – 10 min. Pradmenų jungimosi temperatūra varijuoja nuo 58 iki 66°C priklausomai nuo geno. PGR produktas analizuojamas vykdant elektroforezę 7,5% poliakrilamido gelyje arba 2% agarozės gelyje (23 pav.). Mėginys yra metilintas, jei produktas nustatomas MSP reakcijos su M pradmenimis arba su M ir U pradmenimis būdu. Nustačius produktą vykstant reakcijai tik su U pradmeniu mėginys laikomas nemetilintu.



MSP M ir U pradmenų atrankumas tikrintas vykdant reakciją su nemodifikuota DNR ir naudojant kontrolinę *in vitro* metilintą DNR (*CpG Methylase; New England BioLabs*), vėžinių ląstelių linijų DNR ir leukocitų DNR kaip neigiamą kontrolę. Tarša kontroliuota atliekant kiekvieną tyrimą.



Geno *TP53* mutacijos tirtos genetiniu analizatoriumi ABI 3130 (*Applied Biosystems*), taikant DNR grandinės konformacijos kitimų nustatymo metodą (SSCP). Šiuo metodu identifikavus pakitusį piką toliau vykdyta sekoskaita.

SSCP tyrimui atlikti geno *TP53* egzoni (5-9) pagausinti PGR metodu, naudojant skirtingomis fluorescencinėmis žymėmis (6-karboksifluoresceinu (6-FAM) ir 4,7,2',4',5',7'-heksachloro-6-karboksifluoresceinu, *HEX*) žymėtus prasminius ir antiprasminius pradmenis. Reakcijai naudota: 2 µl *GeneAmp* 10 x PGR buferio, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP mišinio, 1 vnt. *AmpliTaqGold* polimerazės, po 0,4 µl (20 µM) 6-FAM žymėto prasminio pradmens ir HEX žymėto antiprasminio pradmens, 0,5 µl DMSO, 100 ng tiriamosios DNR. Bendrasis vieno mėginio reakcijos tūris neviršijo 20 µl. PGR reakcija vykdyta: 95°C temperatūroje – 10 min., 95°C temperatūroje – 30 sek., pradmenų jungimo temperatūroje – 30 sek., 74°C temperatūroje – 1 min., 74°C temperatūroje – 10 min. PGR ciklai kartoti 40 kartų. Pradmenų jungimo temperatūra atitinkamų egzonų pradmenims: 5 – 58°C; 6 – 60°C; 7 – 60°C; 8 – 58°C ir 9 – 56°C. Po pagausinimo PGR produktas analizuotas 7,5% nedenatūruojančiame poliakrilamido gelyje norint įvertinti pagausinto DNR fragmento kokybę ir kiekybę. Ruoštas SSCP analizės mišinys: 0,5 µl PGR produkto, 0,5 µl *GeneScan-500* LIZ arba ROX ilgio standarto (*Applied Biosystems*) ir 15µl HiDi formamido. Mišinys perkeltas ant plokštelės ir analizuotas 3130 genetiniu analizatoriumi (*Applied Biosystems*). Atskyrimo terpei naudotas 3130 CAP polimeras, turintis 10% glicerolio ir 1 x EDTA buferio. Elektroforezė vykdyta 43 min. 15 kV elektros lauke 18 °C ar 35 °C temperatūroje. Rezultatai analizuoti naudojant *GeneMapper*® programą.

Sekoskaita vykdyta ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystems*) genetiniu analizatoriumi. Tiriamojo geno *TP53* egzoni pagausinti PGR metodu. Reakcijai naudotas 2µl *GeneAmp* 10 x PGR buferinis tirpalas, 3,2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 4 mM dNTP mišinys, 0,1 µl 5 vnt./µl *AmpliTaqGold* polimerazės (*Applied Biosystems*), po 0,5µl 20 µM prasminio ir antiprasminio pradmenų, 10,7 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 100 µg/ml vėžinės DNR. Naudotas vieno mėginio bendrasis reakcijos tūris – 20 µl. PGR reakcija vykdyta: 95°C temperatūroje – 10 min.,

95°C – 30 sek., 60°C – 30 sek., 74°C – 1 min., 74°C – 10 min. PGR ciklai kartoti 36 kartus. PGR produktas analizuotas 1,5% agarozės arba 7,5% nedenaatūruojančiame poliakrilamido gelyje. Tolesniems etapams atrinkti tik sėkmingai pagausinti PGR produktai.

PGR produktas (DNR konc. – 500 µg/ml) skiestas 100 kartų. Sekoskaitos mišinį PGR reakcijai atlikti sudarė 8µl *BigDye terminator v3,1 Ready Reaction mix*, 1,6 µl 2 pmol prasminio arba antiprasminio pradmens, 5,8 µl H<sub>2</sub>O ir 5 µl PGR produkto. Naudotas bendras vieno mėginio reakcijos tūris – 20 µl. Sekoskaitos PGR reakcija vykdyta optimaliomis sąlygomis: 96°C temperatūroje – 1 min., 96°C – 10 sek., 50°C – 5 sek., 60°C – 4 min. PGR ciklai katoti 25 kartus.

Iš pagausintos DNR išvalyti neįjungti žymėti nukleotidai, kurie trukdo vykti sekoskaitos reakcijai. Į pagausintą DNR pridėta 1,25 µl 0,5 M *EDTA* ir 60 µl 100% etilo alkoholio. Mėginiai inkubuoti kambario temperatūroje 15 min., centrifuguoti 30 min. 13000 rpm jėga 4°C temperatūroje. Supernatantas pašalintas. Įpylus 60 µl 70% etanolio, centrifuguota 30 min. 13000 rpm jėga, 4°C temperatūroje, supernatantas pašalintas. DNR džiovinta 37°C temperatūroje.

Sekoskaitai paruošti DNR mėginiai ištirpinti 12 µl formamido tirpale ir perkelti ant plokštelės, kur vėliau analizuoti 3130 genetiniu analizatoriumi. Atskyrimo terpei naudotas 3130 POP-7 polimeras (*Applied Biosystems*), 1 x *EDTA* buferis. Elektroforezė vykdyta 30 min. 15 kV elektros lauke. Gauta seka analizuota maudojant *SeqScape* programą, palyginta su geno seka iš Genų banko.

### **3.3. Statistinė analizė**

Atlikta duomenų padėties ir sklaidos statistinė analizė, kiekybiniai duomenys pateikti kaip aritmetinis vidurkis ± standartinis nuokrypis. Esant duomenų sklaidos nuokrypiui į kairę (HER2, Ki67, HIF1α, SATB1, p53, p16), tolesnei parametrinei statistikai naudotos šių kintamųjų logaritmuotos vertės.

Kiekybinėms kintamųjų variacijoms įvairiose veiksmų grupėse palyginti naudota vienfaktorinė variacijų analizė (ANOVA) pagal Fisherio kriterijų, pritaikant *Bonferroni (Dunn)* t testą poriniams palyginimams. Kokybinių bei ranginių dydžių sąsajoms nustatyti naudota lentelių analizė, panaudojant  $\chi^2$  ir Fisherio tikslųjį kriterijų; kiekybiniai dydžiai šiai ir kitoms neparametrinėms analizėms dichotomizuoti, atsižvelgiant į jų sklaidos medianas bei mokslinėje literatūroje panaudotas ribines vertes. Kiekybinių dydžių porinėms sąsajoms įvertinti naudota Pearsono koreliacijos analizė. Daugiamatei kiekybinių kintamųjų sąsajų analizei atlikti taikyta faktorinė analizė, panaudojant principinių komponentų metodą ir bendrąją *orthomax* veiksmų rotaciją. Faktorinės analizės būdu nustatytų veiksmų vertės panaudotos klasterinėje analizėje, įvertinant tiriamųjų grupės heterogeniškumą. Kintamųjų nustatymo (tyrėjų bei metodų) variacijoms įvertinti taikyta sutarimo analizė, naudojant  $\kappa$  statistiką,  $\kappa$  vertes nuo 0,81 iki 1,00 vertinant kaip „beveik tobulą“ sutarimą [145], rezultatus pateikiant kaip pasvertąjį  $\kappa$  esant 95% pasiklautinumo intervalui. Išgyvenimo statistinei analizei taikyti Kaplano-Meierio išgyvenamumo ir Coxo regresijos metodai. Taikytas statistinio patikimumo lygmuo  $p < 0,05$ . Statistinė analizė atlikta SAS 9,2 programiniu paketu.

### **3.4. Etiniai aspektai**

Prieš pradėdant tyrimą pacientės supažindintos su tyrimo tikslu ir eiga, pateikiant informuoto asmens sutikimo formą. Savo sutikimą dalyvauti tyrime pacientės patvirtino parašu.

Tyrimas pradėtas gavus Lietuvos bioetikos komiteto leidimą (2007-08-03 Nr.: 33), 1 priedas.

## **4. REZULTATAI**

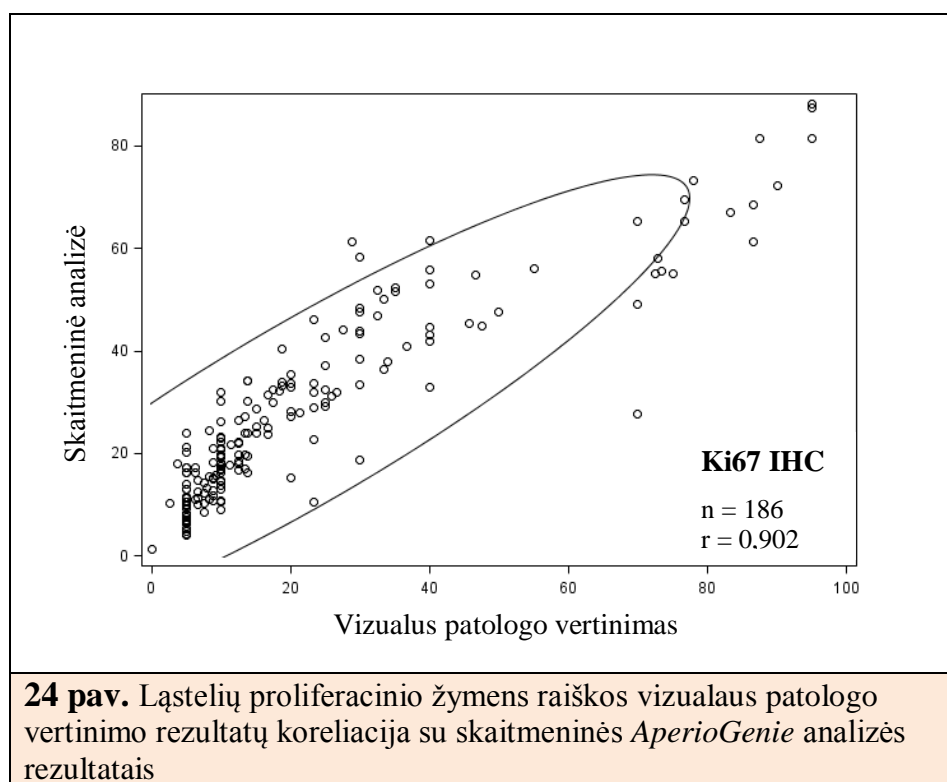
### **4.1. Imunohistocheminių žymenų raiškos skaitmeninės analizės kalibravimas**

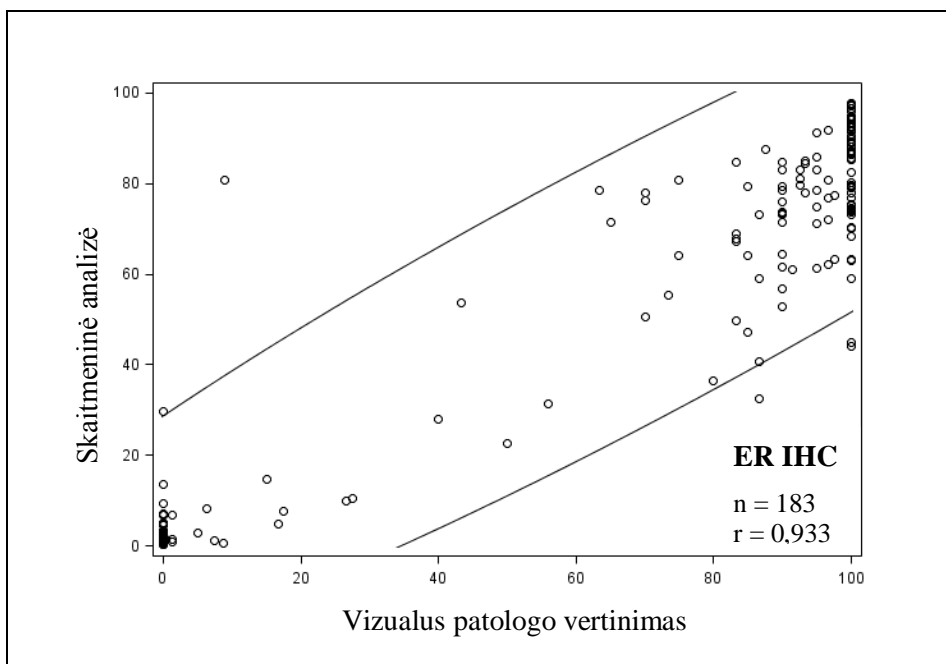
Skaitmeninei IHC analizei atlikti naudotas *AperioGenie* membraninis ir *AperioGenie* branduolinis algoritmai. Siekiant kalibruoti pasirinktus analizės algoritmus, jie lyginti su kitomis to paties objekto matavimo sistemomis. Skaitmeninės branduolinių IHC žymenų analizės rezultatai lyginti su stereologinės skaitmeninio vaizdo analizės rezultatais, membraninių IHC žymenų analizė – su kito gamintojo skaitmeninės analizės bei FISH rezultatais. Visų analizių rezultatai palyginti tarpusavyje bei su gydytojo patologo vizualaus vertinimo rezultatais.

#### **4.1.1. Baltymų raiškos skaitmeninės analizės rezultatų palyginimas su patologo vertinimo rezultatais**

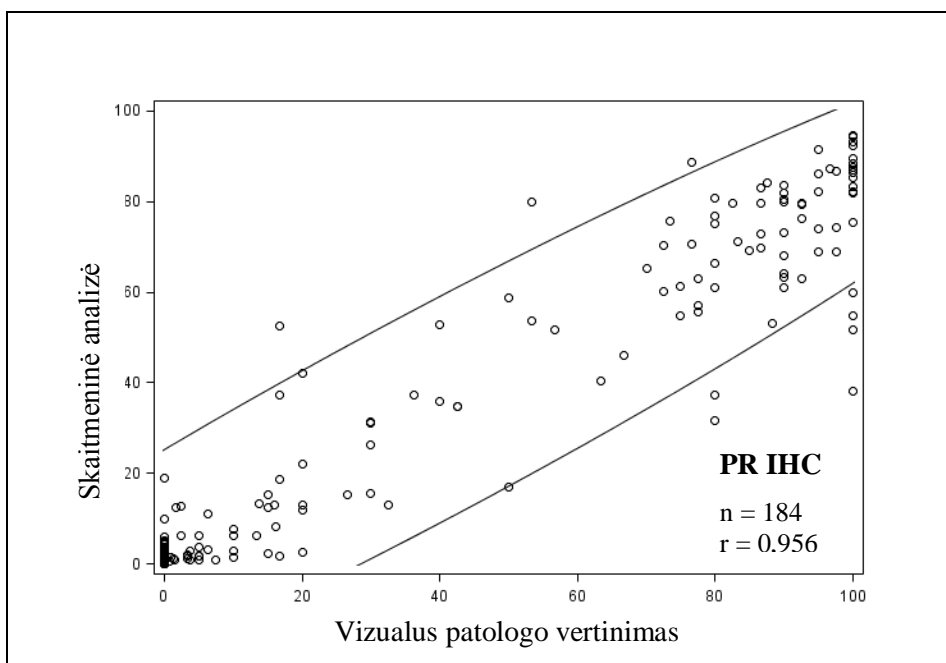
Baltymų raiškos IHC tyrimų rezultatus gydytojas patologas vertino analizuodamas monitoriuje matomą skenuotą TMA mikropreparatų vaizdą. Pirmame analizės etape gydytojas patologas vertino mėginių kokybę. Nekokybiški mėginiai (suardytas audinio vientisumas, nepakankamas navikinio audinio kiekis, dažymosi artefaktai) ir mėginiai, kuriuose nustatytas *in situ* duktalinės karcinomos komponentas, nenaudoti tolesnei analizei. Toliau analizuojamus mėginius TMA gydytojas patologas vertino individualiai, IHC tyrimų rezultatai apskaičiuoti susumavus kiekvienos pacientės visų mėginių analizės rezultatus, vėliau apskaičiuotos vidurkių vertės. IHC tyrimų rezultatai apskaičiuoti vadovaujantis CAP gairėmis. Tų pačių TMA IHC vaizdų skaitmeninė analizė atlikta naudojant tik kokybiškus TMA mėginius. Tolesnei analizei naudotas skaitmeninės analizės būdu apskaičiuotų teigiamų naviko ląstelių branduolių (ER, PR, AR, Ki67, p53, p16, SATB1 ir HIF1 $\alpha$ ) ir ląstelių su nepertraukiamu membraniniu nusidažymu (HER2 ir BCL2) procentas (kiekvienos pacientės visuose į analizę patekusiųose mėginiuose apskaičiuotas

teigiamos ir neigiamos raiškos naviko ląstelių skaičius). Į tolesnę analizę įtrauktos pacientės, kurių mėginiuose suskaičiuota >500 naviko ląstelių (n=109). Atrinkti mėginiai analizuoti naudojant daugiavariacinę 10 IHC žymenų analizę. Siekiant palyginti skaitmeninę IHC baltymų raišką su patologo vizualiu vertinimu, pasirinktos vizualaus vertinimo vidurkių ir skaitmeninės analizės metodu nustatytos bendrosios mėginių raiškos procentinės reikšmės. Visų tirtų žymenų koreliacija tarp skaitmeninės *AperioGenie* (branduolinės ir membraninės) analizės rezultatų ir patologo vertinimo rezultatų labai stipri (24, 25 ir 26 pav.).





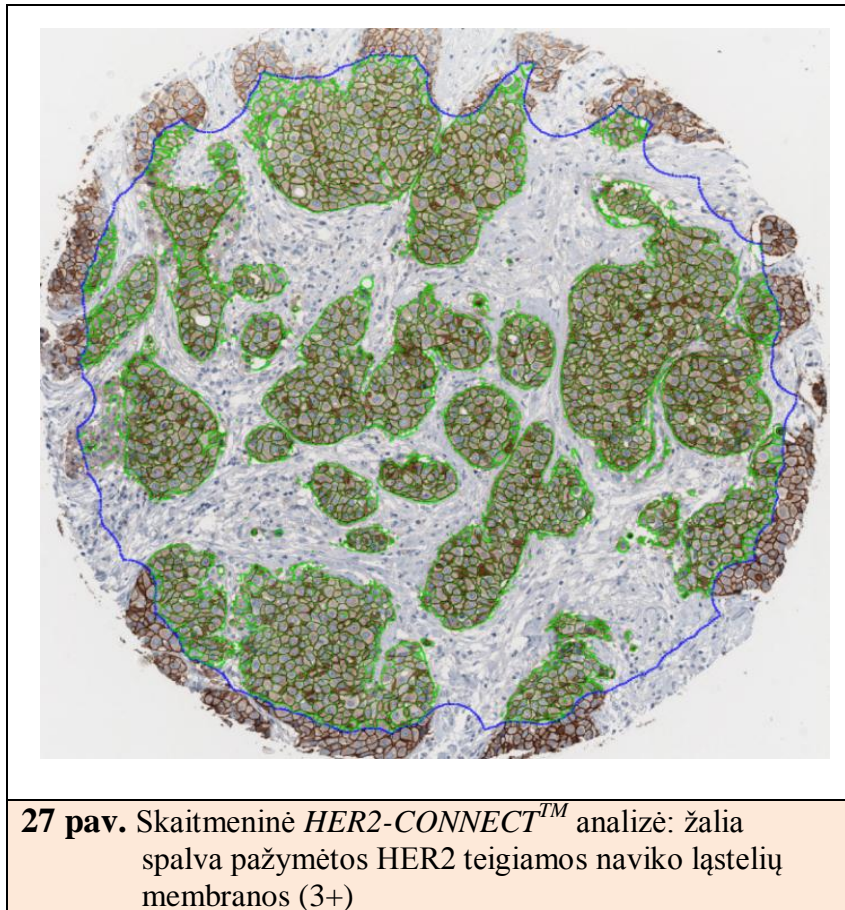
**25 pav.** Estrogenų receptorių raiškos vizualaus patologo vertinimo rezultatų koreliacija su skaitmeninės *AperioGenie* analizės rezultatais

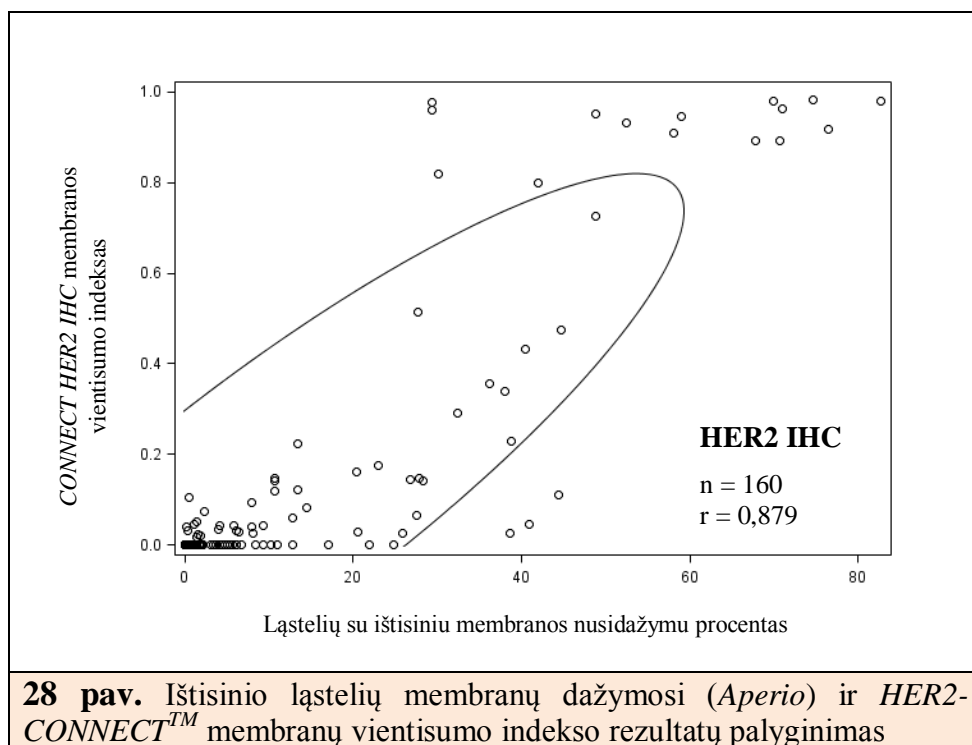


**26 pav.** Progesteronų receptorių raiškos vizualaus patologo rezultatų koreliacija su skaitmeninės analizės vertinimo rezultatais

#### 4.1.2. Baltymų raiškos dviejų skaitmeninių analizių rezultatų palyginimas

*AperioGenie* membraninių analizių rezultatams palyginti pasirinktas HER2 biologinis žymuo (n=160). IHC analizės rezultatai audinių mikrogardelėse įvertinti naudojant membraninį *AperioGenie* analizės algoritmą ir HER2-CONNECT<sup>TM</sup> (*Visiopharm, Hoersholm, Danija*) analizę (27 pav.). Tarp abiejų skaitmeninių analizių rezultatų koreliacija buvo labai stipri,  $r = 0,879$  (28 pav.).





#### 4.1.3. Baltymų raiškos skaitmeninės analizės rezultatų palyginimas su analizės fluorescencinės *in situ* hibridizacijos rezultatais

Membraninė skaitmeninė HER2 IHC analizė lyginta su vizualaus patologo vertinimo rezultatais ir „aukso standarto“ - FISH tyrimo metodu gautais rezultatais (n=152)[146]. Visos analizės atliktos naudojant tas pačias audinių mikrogardeles. Patologas IHC tyrimo rezultatus vertino dviejų mėnesių laikotarpiu du kartus (VV1 – pirmasis patologo vertinimas, VV2 – antrasis patologo vertinimas). Kiekvieną naviko mėginį, esantį audinių mikrogardelėse, patologas vertino individualiai, apskaičiuodamas HER2 IHC tyrimo reikšmę (0, 1+, 2+ ir 3+). Atliekant tolesnę analizę navikai, kuriuose nustatyta neigiama HER2 IHC raiška, sujungti į vieną grupę (0/1+). FISH tyrimas atliktas rankiniu būdu, tyrėjui nežinant IHC HER2 tyrimo rezultatų. HER2 FISH tyrimo duomenys interpretuoti vadovaujantis *FDA* patvirtintomis duomenų skaičiavimo schemomis, kuriuose teigiama HER2 geno amplifikacija nustatoma HER2/CEP17 santykiui esant didesniau už 2. FISH analizei pasirinktas



tinkamiausias vienas iš keturių kiekvienos pacientės naviko mėginys, kuriame įvertinta 20 naviko ląstelių branduolių.

Pradiniai HER2 IHC (vizualaus ir skaitmeninio) bei FISH tyrimo vertinimo duomenys pateikti 6 lentelėje. Skaitmeninės analizės ir abiejų patologo vertinimų reikšmės daugumos HER2 neigiamų (0/1+) ir teigiamų (3+) navikų kategorijų grupėse sutapo su skaitmeninės analizės rezultatais ( $\kappa=0,86$ ). Didžiausia vertinimo variacija matoma tik HER2 IHC tyrimo 2+ kategorijoje. Palyginus gautus rezultatus su FISH tyrimo reikšmėmis, matyti, kad 5 FISH tyrimu nustatyti HER2 teigiami pacienčių mėginiai pateko į sujungtą HER2 IHC tyrimu nustatytą neigiamų navikų kategoriją (0/1+), IHC tyrimo rezultatus vertinant tiek vizualiai, tiek naudojant skaitmeninę vaizdo analizę (5 lentelė). Į HER2 neigiamų navikų kategoriją pirmojo patologo vertinimo metu pateko papildomi dar 3, tolesniu – 2 pacienčių mėginiai. Atlikus jų FISH tyrimą, gauti teigiami HER2 geno amplifikacijos rezultatai. Daugiausia teigiamų HER2 mėginių HER2 2+ ir 3+ grupėse nustatyta SA (3+16=19), mažiau antruoju patologo vertinimu (VV2) (2+15=17) ir pirmuoju patologo vertinimu (VV1) (2+14=16). Tačiau, skaitmeninės analizės rezultatais, į 3+ navikų kategoriją pateko 4 mėginiai, kai, atlikus HER2 FISH tyrimą, gauti neigiami HER2 rezultatai. Tie patys 4 mėginiai VV1 ir VV2 vertinimu pateko į HER2 3+ arba 2+ grupę (6 lentelė).

Panaudojus HER2 analizę kaip modelį skaitmeninės ląstelių plazminės membranos baltymų raiškos analizės patikimumui įvertinti nustatyta, kad HER2 raiškos krūties vėžio audinyje skaitmeninės vaizdo analizės rezultatai atitiko patologo vertinimą ( $\kappa=0,86$ ) ir leidžia tiksliau nustatyti amplifikuoto (HER2 FISH) krūties vėžio atvejus. Naudojant SA buvo tiksliau atrinkta FISH tyrimu nustatytų HER2 teigiamų mėginių grupė. Keli nesutapimo atvejai traktuotini kaip biologinio naviko netolygumo (heterogeniškumo) ar testo variacijų pasekmė.

**5 lentelė.** HER2 teigiamų mėginių skaičiaus santykis skirtingose baltymų raiškos kategorijose lyginant patologo vertinimo ir skaitmeninės analizės rezultatus

IHC metodu nustatyta HER2 raiška	FISH metodu nustatyti HER2 teigiami navikai (%)		
	VV1	VV2	SA
0/+1	8/127 (6,3)	7/120 (5,8)	5/113 (4,4)
2+	2/8 (25,0)	2/15 (13,3)	3/19 (15,8)
3+	14/17 (82,4)	15/17 (88,2)	16/20 (80,0)
Iš viso	152	152	152

VV1 ir VV2 – pirmasis ir antrasis patologo vertinimai, SA – skaitmeninė analizė, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2, FISH – fluorescencinis *in situ* hibridizacijos tyrimas

**6 lentelė.** Pradiniai HER2 baltymo raiškos vizualaus ir skaitmeninio bei FISH HER2/CEP17 vertinimo duomenys

Eilė #	HER2/ CEP17	HER2	CEP17	VV1	VV2	SA
1	0,4	1,8	4,2	1	1	1
2	0,5	2,1	4,4	1	1	1
3	0,5	1,9	3,5	1	1	1
4	0,9	3,0	3,4	1	1	1
5	1,1	3,7	3,5	1	1	1
6	1,3	4,2	3,3	1	1	1
7	1,7	5,4	3,1	1	1	1
8	1,8	5,7	3,2	1	1	1
9	1,8	7,1	3,9	1	1	1
10	2,1	2,7	1,3	1	1	1
11	2,3	4,2	1,9	1	1	1
12	2,4	3,2	1,3	1	1	1
13	2,7	3,8	1,4	1	1	1
14	4,6	12,6	2,8	1	1	1
15	0,5	1,5	2,9	1	2	1
16	1,2	1,8	1,6	1	1	2
17	1,3	2,3	1,8	1	1	2
18	1,4	5,7	3,9	1	1	2
19	1,6	4,3	2,7	1	1	2
20	4,5	4,5	1,0	1	1	2
21	1,0	4,9	4,7	2	2	2
22	1,5	6,7	4,5	1	1	2
23	1,6	5,3	3,3	1	1	2
24	2,1	3,8	1,8	1	1	2
25	1,0	2,1	2,1	1	2	2
26	1,3	4,7	3,7	1	2	2
27	1,4	4,1	2,8	1	2	2
28	1,7	5,8	3,5	1	2	2
29	2,0	5,4	2,8	1	2	2
30	2,2	4,3	1,9	1	2	2
31	1,1	4,1	3,7	2	2	2
32	1,2	3,0	2,4	2	2	2
33	1,3	5,0	3,8	2	2	2
34	1,4	3,3	2,4	2	2	2
35	1,5	3,3	2,2	2	2	3
36	3,4	11,3	3,4	2	2	3
37	6,5	12,4	1,9	2	3	3
38	2,3	4,3	1,9	3	3	3
39	1,7	9,0	5,2	3	2	3
40	1,4	2,6	1,8	3	3	3
41	1,5	4,6	3,1	3	3	3

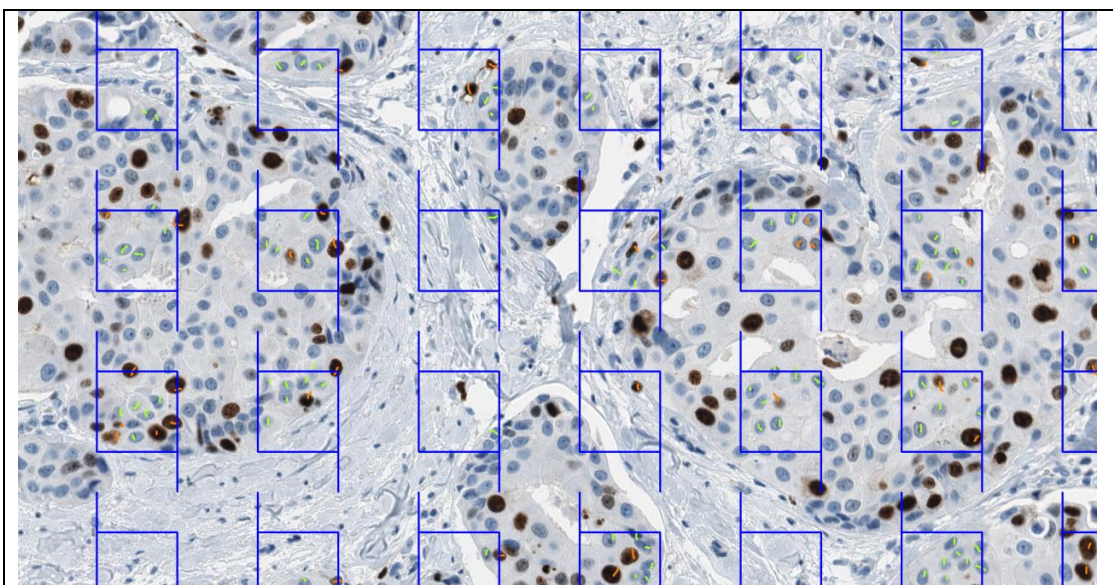
42	4,5	4,5	1,0	3	3	3
43	4,7	10,1	2,2	3	3	3
44	4,9	11,2	2,3	3	3	3
45	4,9	15,5	3,2	3	3	3
46	5,4	13,8	2,6	3	3	3
47	5,9	16,8	2,9	3	3	3
48	6,5	20,4	3,2	3	3	3
49	6,8	13,6	2,0	3	3	3
50	7,2	22,7	3,2	3	3	3
51	7,2	23,2	3,2	3	3	3
52	8,3	22,0	2,7	3	3	3
53	13,1	28,2	2,2	3	3	3
54	13,3	38,5	2,9	3	3	3

VV1 ir VV2 – pirmasis ir antrasis patologo vertinimai, SA – skaitmeninė analizė, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2, CEP 17 – 17 chromosomos centromera, FISH – fluorescencinis *in situ* hibridizacijos tyrimas.

#### 4.1.4. Baltymų raiškos skaitmeninės analizės rezultatų palyginimas su analizės stereologiniu metodu rezultatais

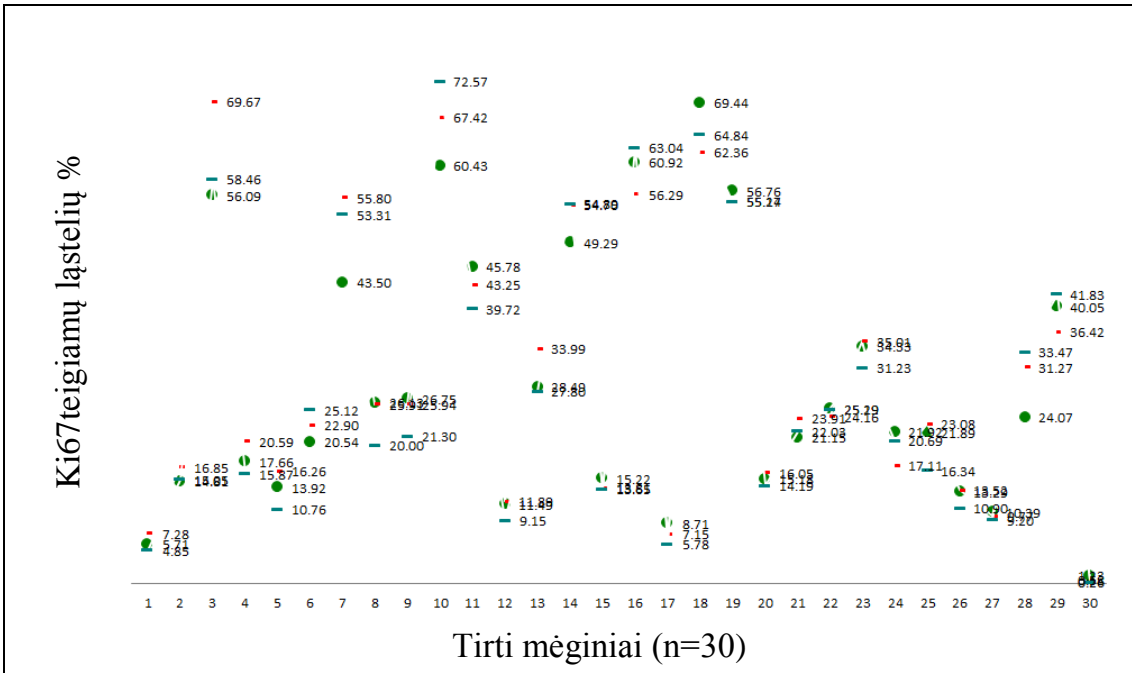
Skaitmeninė analizė pasižymi geresniu atkartojamumu (angl. *reproducibility*), t.y., pakartotinai atlikus to paties objekto analizę tomis pačiomis sąlygomis, matavimo rezultatas praktiškai nesikeičia. Tai yra neabejotinas skaitmeninės analizės pranašumas, palyginti su žmogaus-tyrėjo vertinimu. Tačiau svarbu įvertinti ir skaitmeninės analizės tikslumą (angl. *accuracy*), tai yra sisteminį nuokrypį nuo tikrųjų (referentinių) matuojamojo dydžio verčių. Ir skaitmeninė analizė, ir žmogaus-tyrėjo vertinimas gali būti nukrypęs nuo tikrųjų verčių – tiesos kriterijaus, kitaip „aukso standarto“. Nors patologijos ir skaitmeninės analizės tyrimų praktikoje dažnai tiesos kriterijumi pasirenkamas kvalifikuoto tyrėjo-gydytojo patologo vertinimas, šis taip pat varijuoja ir gali būti sistemiškai nukrypęs nuo referentinių verčių. Pavyzdžiui, vertindamas žymenį ekspresuojančių ląstelių procentą, patologas paprastai remiasi vizualiu įspūdžiu ir pusiau kiekybiniu dydžio įvertinimu. Todėl skaitmeninė analizė (potencialiai tikslesnis įrankis) neturėtų būti kalibruojama pagal pusiau kiekybinį blogiau atkartojamą žmogaus-tyrėjo vizualų vertinimą.

Mūsų darbe skaitmeninės analizės algoritmams kalibruoti naudotas stereologijos metodu nustatytas tiesos kriterijus [100]. Trys tyrėjai nepriklausomai įvertino 30 tų pačių navikinių mėginių skaitmeninius vaizdus, stereologinėse gardelėse pažymėdami Ki67 teigiamus ir neigiamus vėžio ląstelių branduolius (29 pav.). Nepaisant to, kad tai yra žmogaus–tyrėjo vertinimas, jis pagrįstas ne vizualiu išpūdžiu, bet individualiu ląstelių įvertinimu ir tiksliu suskaičiavimu.

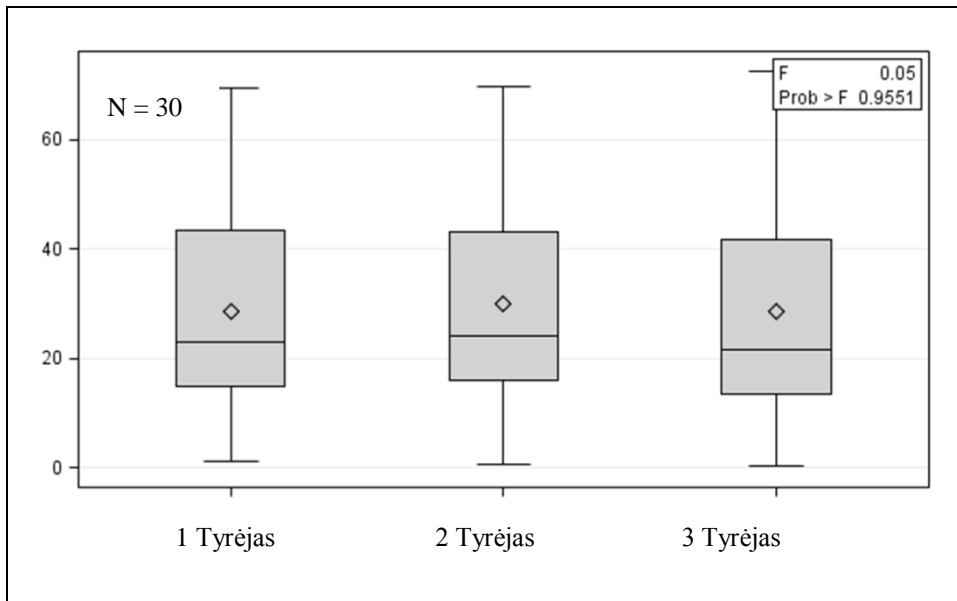


**29 pav.** Stereologijos metodas. Pasirinkto dydžio stereologiamame tinklėlyje Ki67 žymeniui teigiami naviko ląstelių branduoliai pažymėti oranžine, neigiami – žalia spalvomis

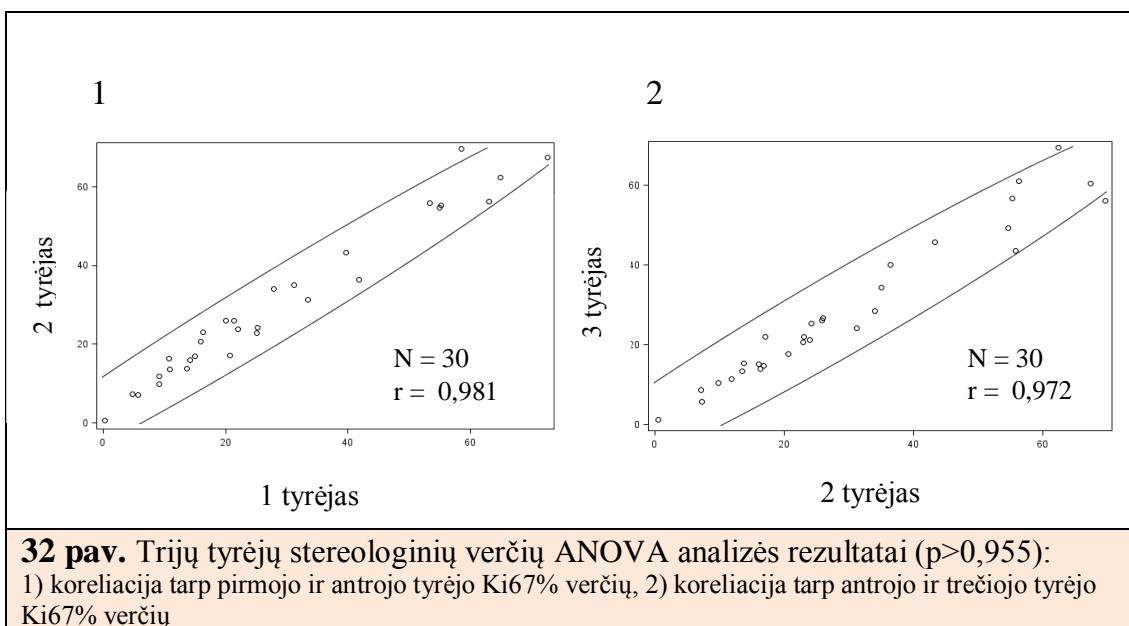
Trijų tyrėjų stereologinio vertinimo rezultatai buvo panašūs (pirminiai duomenys pateikti 30 pav.), skirtingi tyrėjai nebuvo reikšmingas variacijų šaltinis (*ANOVA* analizės duomenimis  $p=0,955$ , 31 ir 32 pav.).



30 pav. Stereologijos metodas. Trijų tyrėjų Ki67 raiškos vertinimo palyginimas

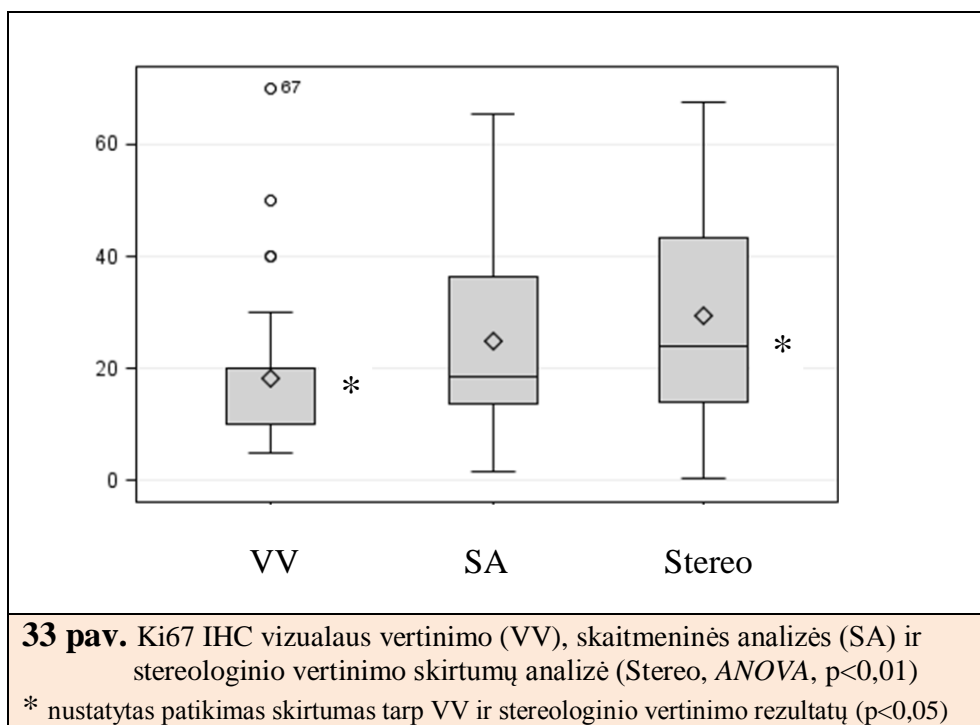


31 pav. Stereologijos metodas. Trijų tyrėjų stereologinių verčių rezultatų palyginimas, ANOVA analizės duomenimis  $p > 0,955$ .



Visų trijų tyrėjų stereologinių vertinimų tarpusavio koreliacijos koeficientai buvo artimi 1 ( $p < 0,0001$ ). *AperioGenie* branduolinio algoritmo, stereologinių vertinimų ir vizualaus vertinimo rezultatų koreliacija pateikta 33 pav. Skaitmeninės analizės rezultatai labai stipriai koreliavo su stereologinių vertinimų rezultatais ( $r = 0,95$ ) ir kiek silpniau – su patologo vizualaus vertinimo rezultatais ( $r = 0,86$ ). Pažymėtina, kad to paties patologo vizualus ir stereologinis vertinimas koreliavo silpniau nei patologo vertinimas ir skaitmeninė analizė. Nėgana to, ANOVA analizės duomenimis, patologo vizualaus vertinimo rezultatų vidurkis statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) skyrėsi nuo stereologinio vertinimo rezultatų vidurkio ir buvo beveik 10 procentų mažesnis. Kita vertus, skaitmeninės analizės ir stereologinio vertinimo rezultatų vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė.

Taigi Ki67 skaitmeninės analizės kalibravimo eksperimentas patvirtino, kad skaitmeninės analizės rezultatai statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo stereologiškai nustatyto tiesos kriterijaus ir yra tinkamas branduolinių IHC žymenų raiškos vertinimo metodas.



#### 4.2. Krūties duktalinės karcinomos imunohistocheminio tyrimo skaitmeninė analizė

IHC naviko charakteristikos/kiekybiniai skaitmeninio vertinimo rezultatai pateikti 7 lentelėje.

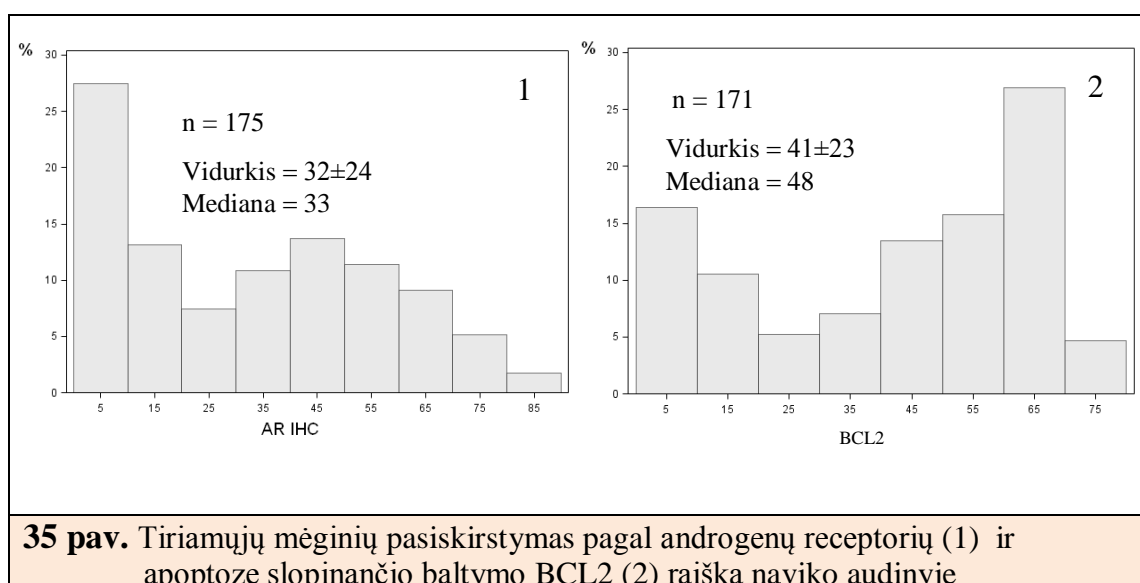
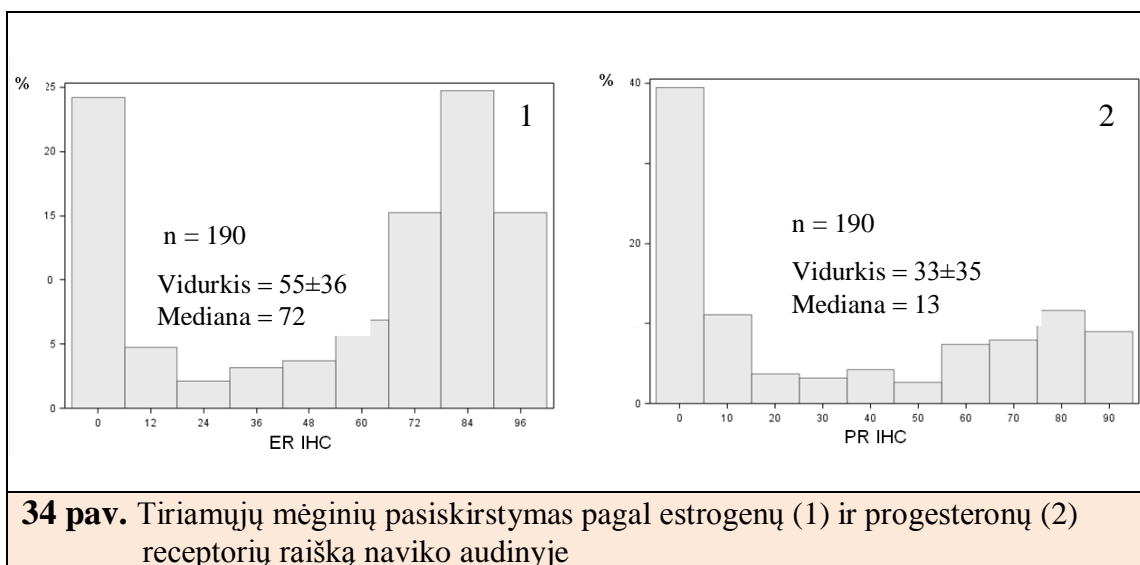
**7 lentelė.** Skaitmeninės baltymų raiškos analizės rodikliai duktalinėse krūties karcinomose

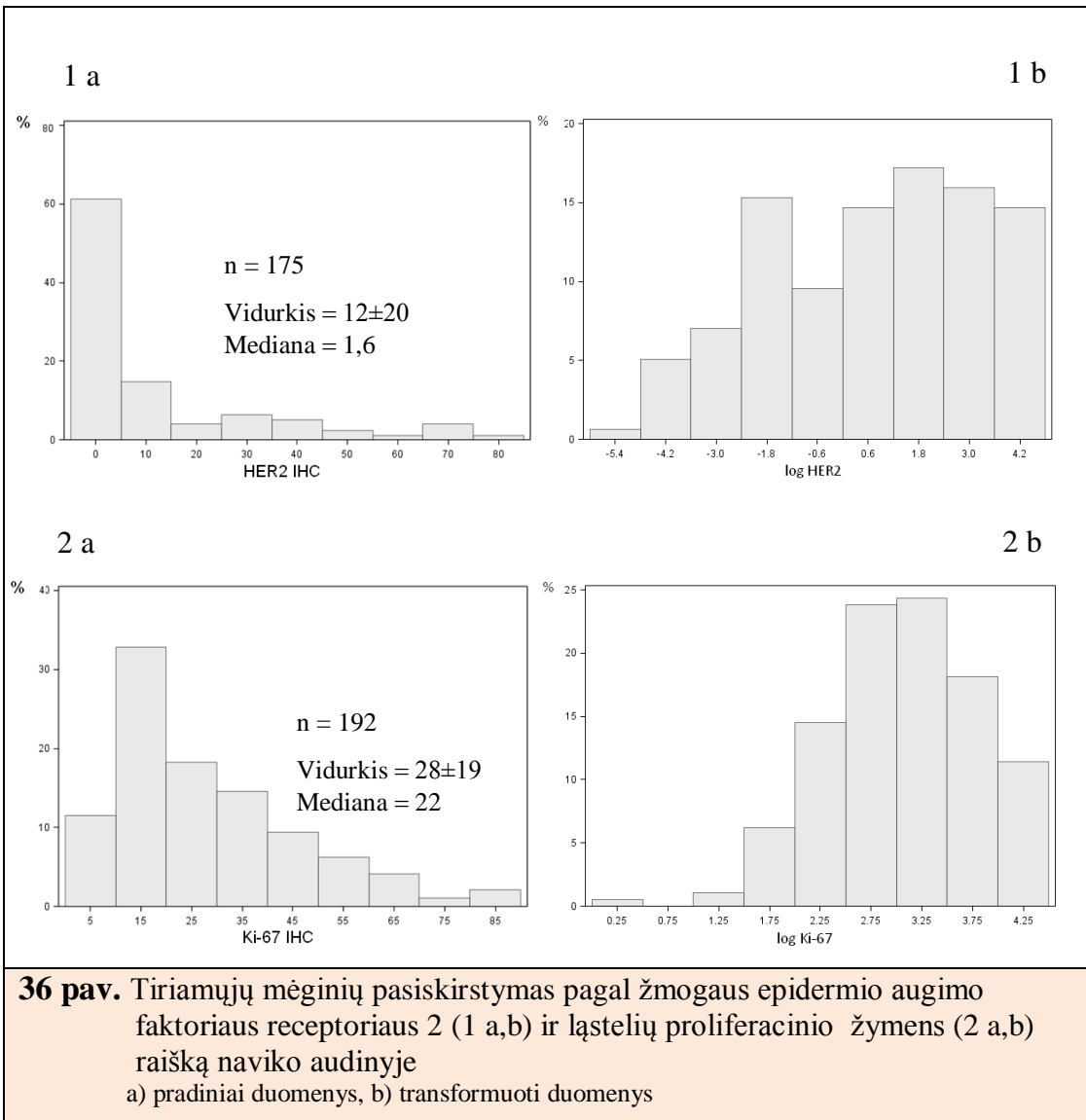
Žymuo	Teigiamų naviko ląstelių vidurkis, %	Standartinis nuokrypis	Min	Max	Mediana	n
ER	54,8	36,4	0,3	97,7	72,3	190
PR	33,4	34,6	0,01	94,6	13,3	190
HER2	12,1	19,7	0	82,7	1,6	175
Ki67	27,8	18,7	1,2	88,2	22,2	192
BCL2	41,7	23,4	0,5	75,1	47,9	171
p53	21,3	26,0	0	94,2	10,2	193
p16	17,0	15,2	0,5	75,9	12,3	193
AR	32,2	24,1	0,4	89,2	33,6	175
HIF1 $\alpha$	9,1	12,0	0,2	62,8	4,8	173
SATB1	8,7	7,5	0,8	56,9	6,8	165

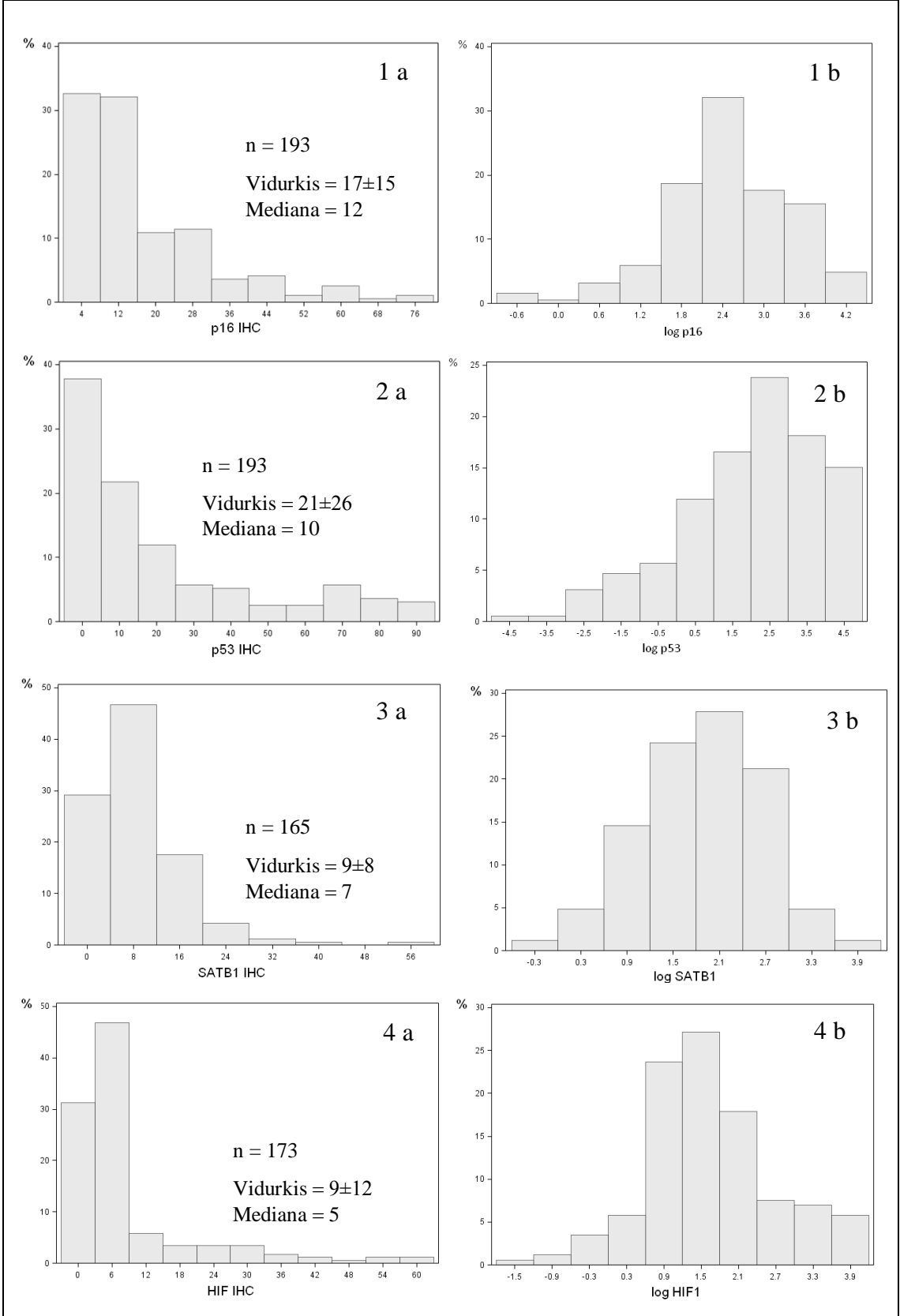
ER – estrogenų receptoriai, PR – progesterono receptoriai, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriai 2, AR – androgenų receptoriai, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53, p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys.



IHC žymenų raiškos (teigiamų naviko ląstelių %) pasiskirstymas pateiktas histogramose. Nustatytas ER, PR ir BCL2 raiškos bimodalinis pasiskirstymas (34 ir 35 pav.), o AR raiškos – bimodalinis su kairiuoju nuokrypiu (35 pav.). Pagal HER2, Ki67, p16, p53, SATB1 ir HIF $\alpha$  žymenų raišką atvejai buvo pasiskirstę su nuokrypiu į kairę. Siekiant toliau analizuoti IHC žymenis atlikta šių duomenų lognormalinė transformacija, kurios išraiška kartu su išvardytų žymenų raiškos pasiskirstymu pateikta 36 ir 37 pav.







**37 pav.** Tiriamųjų mėginių pasiskirstymas pagal vėžio supresorių p16 (1 a,b) ir p53 (2 a,b), transkripcijos veiksnio (3 a,b) ir hipoksiją aktyvinančio baltymo (4 a,b) raišką naviko audinyje  
a) pradiniai duomenys, b) transformuoti duomenys

Luminalinis A ir luminalinis B tipai išsiskyrė dažna BCL2 (95% ir 73%, 9 lentelė) bei reta HIF1 $\alpha$  (8% ir 20%) žymenų raiška ( $p < 0,0001$ ), o luminalinis A tipas dar pasižymėjo ir dažna AR raiška (72%,  $p < 0,0001$ ). HER2 teigiamų navikų grupėje (LB HER2+ ir HER2+) p53 baltymo raiška konstatuota atitinkamai 74% ir 64%, tačiau statistiškai reikšmingo p53 baltymo raiškos skirtumo pagal naviko biologinius tipus nenustatyta. Pažymėtina, kad HER2+ navikų grupėje skirtinga BCL2 ir HIF1 $\alpha$  žymenų raiška: luminalinio B HER2+ navikų grupėje BCL2 raiška yra dažna (50%), HIF1 $\alpha$  - reta (13%), HER2+ grupėje BCL2 raiška – reta (8%), HIF1 $\alpha$  – dažna (73%). Nustatyti skirtumai yra statistiškai reikšmingi ( $p < 0,0001$ ). Trejopai neigiamų navikų grupėje nustatyta dažna p16 (79%,  $p < 0,0001$ ) žymens raiška. Šioje navikų kategorijoje AR (10%) ir BCL2 (23%) žymenų raiška yra reta.

#### 8 lentelė. Baltymų raiškos dažnis duktalinėse krūties karcinomose

Žymuo*	Dažnis	Procentas	n
Tiriamieji mėginiai (n=203)			
ER >10%	141	73,0	193
PR >10%	105	54,4	193
HER2 >10%	37	18,2	203
Ki67 >14%	143	74,0	193
AR >30%	89	50,6	176
BCL2 >30%	116	67,4	172
HIF1 $\alpha$ >10%	40	22,9	175
p16 >14%	76	40,6	187
p53 >5%	125	64,8	193
SATB1 >10%	57	33,9	168

\* Žymuo ir žymens teigiamos raiškos naviko ląstelėse slenkstinė vertė.

ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53 ir p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys.

**9 lentelė.** Baltymų raiškos dažniai įvairiose biologinio tipo kategorijose

Žymuo*	LA n (%)	LB n (%)	LB HER2+ n (%)	HER2+ n (%)	TN n (%)	n	p
Tiriamieji mėginiai	89 (45)	41 (20)	25 (12)	13 (6)	35 (17)	203	
ER >10%	84 (100)	32 (80)	21 (91)	0 (0)	4 (12)	193	<0,0001
PR >10%	70 (83)	23 (58)	10 (44)	0 (0)	2 (6)	193	<0,0001
HER2 >10%	0 (0)	0 (0)	24 (96)	13 (35)	0 (0)	203	<0,0001
Ki67 >14%	42 (50)	39 (98)	17 (74)	12 (100)	33 (97)	193	<0,0001
AR >30%	53 (72)	20 (54)	8 (35)	5 (45)	3 (10)	176	<0,0001
BCL2 >30%	71 (95)	27 (73)	11 (50)	1 (8)	6 (23)	172	<0,0001
HIF1α >10%	6 (8)	7 (20)	3 (13)	8 (73)	16 (50)	175	<0,0001
p16 >14%	25 (31)	13 (33)	8 (38)	3 (27)	27 (79)	187	<0,0001
p53 >5%	47 (56)	30 (75)	17 (74)	8 (67)	23 (68)	193	
SATB1 >10%	16 (23)	12 (34)	9 (41)	4 (44)	16 (52)	168	0,0142

\* Žymuo ir žymens teigiamos raiškos naviko ląstelėse slenkstinė vertė.

Lentelėje pateiktos tik reikšmingos ( $p < 0,05$ ) vertės.

ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53 ir p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1α – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys, naviko biologinis tipas: LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, LB HER2+ – luminalinis B HER2+, HER2+ – ne luminalinis HER2+, TN – trejopai neigiamas.

### 4.3. Duktalinės krūties karcinomos genetinė analizė

Ištirus 106 mėginius nustatėme, kad dažniausiai hipermetilinami genai duktalinėse krūties karcinomose buvo *RASSF1* (69%) ir *ESR1* (pirmas fragmentas – 50%, antras – 64%). Kiek rečiau hipermetilinami buvo genų *MGMT* (25%), *RARB* (20%), *GSTP1* (19%) ir *DAPK1* (15%) promotoriai. Ypač retai epigenetinės pažaidos vyko genų *p16* (5%) ir *p14* (2%) promotoriuose. Nustatytos 28% navikų geno *TP53* mutacijos.

Dažniausiai hipermetilintų genų *ESR1* ir *RASSF1* pakitimų dažnis siekė 86%, o kartu su geno *RARB* hipermetilimu – 90%.

Epigenetinių ir genetinių pakitimų dažniai pagal biologinį krūties naviko subtipą pateikti 11 lentelėje.

*RASSF1* ir *ESR1* (*ESR1-1* ir *ESR1-4*) genų hipermetilavimo dažniai buvo panašūs visuose luminalinio tipo navikuose: luminalinio A tipo navikuose 78%, 52% ir 75%; luminalinio B tipo navikuose 62%, 52% ir 67%, o luminalinio B HER2+ tipo navikuose atitinkamai 71%, 47% ir 92%. HER2+ tipo navikuose dažnas hipermetilavimas nustatytas ne tik genų *RASSF1* (67%),

*ESR1-1* (60%) promotoriuose, bet ir geno *MGMT* sekose (67% (4/106), santykinai dažnai (33%) buvo hipermetilinamas *p16* genas. Geno *TP53* mutacijų dažniai didžiausi (57%) buvo TN navikų grupėje.

Nustatyta statistiškai reikšminga sąsaja tarp naviko diferenciacijos laipsnio ir genų *p14* ( $p=0,012$ ), *RASSF1* ( $p=0,014$ ) hipermetilinimo bei geno *TP53* ( $p=0,00001$ ) mutacijų. Metastazių plitimas į limfmazgius siejosi su geno *GSTP1* hipermetilinimu ( $p=0,053$ ).

Nustatytos reikšmingos sąsajos tarp epigenetinių/genetinių ir IHC žymenų. Estrogenų receptorių raiška, nustatyta skaitmeninės analizės būdu ir suskirstyta į teigiamus ir neigiamus atvejus, siejosi su genų *RASSF1* ( $p=0,023$ ), *ESR1* ( $p=0,008$ ) hipermetilinimu ir geno *TP53* mutacijomis ( $p=0,006$ ). Progesteronų receptorių raiška siejosi su genų *p16* ( $p=0,038$ ) ir *ESR1-4* ( $p=0,033$ ) hipermetilinimu. Nustatyta reikšminga sąsaja tarp geno *TP53* mutacijų ir ląstelių proliferacijos žymens Ki67 ( $p=0,039$ ). Svarbu pažymėti, kad geno *TP53* mutacijos, tirtos genetiniais metodais, statistiškai reikšmingai ( $p=0,011$ ) siejosi su baltymo p53 raiška, nustatyta IHC tyrimu. Panašus ryšys nustatytas tiriant *ESR1* geną, kur promotoriaus ketvirtojo fragmento hipermetilinimo statusas statistiškai reikšmingai ( $p=0,008$ ) koreliavo su baltymo raiška.

#### **4.4. Tiriamųjų mėginių analizė pagal naviko biologinį tipą**

Atsižvelgiant į patologo ER, PR, HER2 ir Ki67 IHC vizualaus vertinimo rezultatus (8 lentelė), tiriamieji mėginiai suskirstyti į biologinius tipus. Apie du trečdaliai navikų buvo luminalinio A (LA; 44%) ir luminalinio B (LB; 20%) tipo navikai. Kitą duktalinių karcinomų grupę sudarė HER2 teigiami navikai: luminalinio B tipo (LB HER2+; 12%) ir ne luminalinio tipo (HER2+; 6%) navikai. Trejopai neigiamų (TN; ER-, PR-, HER2-) navikų kategoriją sudarė 35 (17%) pacienčių mėginiai. Nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp biologinio naviko tipo ir ligos stadijos ( $p=0,0001$ ). Blogai diferencijuotų navikų (G3) daugiausia nustatyta tarp trejopai neigiamų navikų

(86%). G3 dominuoja ir tarp ne luminalinio HER2+ (69%) bei luminalinio B tipo navikų (64%). Tarp luminalinio A tipo navikų G3 nustatytas tik 6 (7%) atvejais.

TN ir HER2+ navikai dažniau buvo T2 stadijos (atitinkamai 63% ir 62%), o luminalinio A ir luminalinio B HER2+ tipo navikai, turintys hormonų receptoriaus raišką – T1 stadijos (atitinkamai 61% ir 60%). Nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp naviko biologinio tipo ir T ( $p=0,00002$ ).

**10 lentelė.** Tiriamųjų mėginių pasiskirstymas pagal biologinį naviko subtipą

Parametras	LA N (%)	LB N (%)	LB HER2+ N (%)	HER2+ N (%)	TN N (%)	n	p
Tiriamieji mėginiai	89 (44)	41 (20)	25 (12)	13 (6)	35 (17)	203	
Amžius, m±SD	56,4±13,2	54,6±13,5	55,3±12,2	59,8±12,5	55,7±12,5		
T							0,00002
T1	54 (61)	20 (49)	15 (60)	5 (38)	13 (37)	107	
T2	35 (39)	21 (51)	10 (40)	8 (62)	22 (63)	96	
N							0,0002
N0	45 (52)	18 (45)	13 (52)	7 (54)	21 (64)	104	
>N0	42 (48)	22 (55)	12 (48)	6 (46)	12 (36)	94	
G							0,0001
G1	32 (36)	5 (12)	2 (8)	0 (0)	1 (3)	40	
G2	51 (57)	10 (24)	10 (40)	4 (31)	4 (11)	79	
G3	6 (7)	26 (64)	13 (52)	9 (69)	30 (86)	84	

Lentelėje pateiktos tik statistiškai reikšmingos ( $p<0,05$ ) vertės.

T – pirminis navikas (T1 – navikas  $\leq 2$  cm, T2 – navikas  $> 2$  cm,  $< 5$  cm); N – regioninės metastazės (N0 – regioniniai limfmazgiai nepažeisti, N1 – metastazės 1–3 regioniniuose limfmazgiuose, N2 – metastazės 4–9 regioniniuose limfmazgiuose, N3 – metastazės 10 ir daugiau regioninių limfmazgių); G – naviko diferenciacijos laipsnis (G1 – gerai diferencijuotas, G2 – vidutiniškai diferencijuotas, G3 – blogai diferencijuotas) naviko biologinis tipas: LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, LB HER2+ – luminalinis B HER2+, HER2+ – ne luminalinis HER2+, TN – trejopai neigiamas.

Vertinant genetinių žymenų sąsajas su biologiniu naviko tipu nustatyta, kad geno *ESR1-4* hipermetilinimas buvo statistiškai reikšmingai susijęs su naviko biologiniu tipu ir dažniausiai vyko luminaliniuose navikuose. Su naviko biologiniu tipu taip pat siejosi geno *TP53* mutacijos ir geno *p16* hipermetilinimas.

**11 Lentelė.** Epigenetinių ir genetinių pažaidų dažnis pagal biologinį naviko subtipą

Parametras	LA n (%)	LB n (%)	LB HER2+ n (%)	HER2+ n (%)	TN n (%)	n	p
<i>DAPK</i>	8/47 (17)	2/22 (9)	4/14 (29)	0/6 (0)	1/16 (6)	105	
<i>ESR1-1</i>	24/46 (52)	11/21 (52)	7/15 (47)	3/5 (60)	7/16 (44)	103	
<i>ESR1-4</i>	24/32 (75)	12/18 (67)	11/12 (92)	1/4 (25)	4/13 (31)	79	0,0045
<i>GSTP1</i>	8/47 (17)	5/21 (24)	5/15 (33)	2/5 (40)	0/16 (0)	104	
<i>MGMT</i>	10/47 (21)	6/22 (27)	3/15 (20)	4/6 (67)	3/16 (19)	106	
<i>p16</i>	1/47 (2)	2/22 (9)	0/15 (0)	2/6 (33)	0/16 (0)	106	0,03
<i>p14</i>	2/46 (4)	0/21 (0)	0/14 (0)	0/5 (0)	0/16 (0)	102	
<i>p53</i>	5/44 (11)	9/21 (43)	4/15 (27)	2/5 (40)	8/14 (57)	99	0,003
<i>RARB</i>	10/47 (21)	6/22 (27)	0/15 (0)	2/5 (40)	3/21 (19)	105	
<i>RASSF1</i>	36/46 (78)	13/21 (62)	10/14 (71)	4/6 (67)	8/16 (50)	103	

Naviko biologinis tipas: LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, LB HER2+ – luminalinis B HER2+, HER2+ – ne luminalinis HER2+, TN – trejopai neigiamas; *DAPK1*: apoptozę aktyvinančios kinazės genas, *ESR1*, *ESR2* – estrogenų receptoriaus genai, *GSTP1*: glutationo S-transferazės pi genas 1, *MGMT*: O<sup>6</sup>-metilguanino DNR metiltransferazės genas, *p16*, *p14*, *p53*: naviką slopinantys genai, *RASSF1*: Ras sąveikos domeną turinčių baltymų šeimos genas 1, *RARB*: retinoinės rūgšties receptoriaus β genas.

#### 4.5. Baltymų raiškos krūties duktalinės karcinomos audinyje tarpusavio sąsajos

IHC žymenų spektro analizei (ER, PR, AR, HER2, BCL2, Ki67, HIF $\alpha$ , SATB1, p53, ir p16) atrinkti 109 pacienčių naviko mėginiai, kuriuose, atlikus skaitmeninę analizę nustatytas didesnis nei 500 naviko ląstelių skaičius. Šios pacientų grupės navikų charakteristikos pateiktos 12 lentelėje ir iš esmės atitinka visos pacientų grupės charakteristikas (10 lentelė). Tirtų žymenų raiška įvertinta faktorinės analizės būdu. Prieš faktorinę duomenų analizę atlikta porinės koreliacijos analizė. IHC žymenų pirminių verčių koreliacijos rezultatai pateikti 13 lentelėje.



## 12 lentelė. Pagrindinės tiriamosios grupės charakteristikos

Parametras	LA n (%)	LB n (%)	LB HER2+ n (%)	HER2+ n (%)	TN n (%)	P
Amžiaus grupė						
1 < 55 m. (n=52)	17 (40)	14 (52)	8 (53)	1 (17)	12 (67)	
2 > 55 m. (n=57)	26 (60)	13 (48)	7 (47)	5 (83)	6 (33)	
G						<0,0001
1	16 (37)	2 (8)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	
2	26 (61)	6 (22)	6 (40)	3 (50)	3 (17)	
3	1 (2)	19 (70)	8 (53)	3 (50)	15 (83)	
T						
1	28 (65)	13 (48)	8 (53)	3 (50)	6 (33)	
2	15 (35)	14 (52)	7 (47)	3 (50)	12 (67)	
N						
0	27 (63)	13 (48)	8 (53)	4 (67)	14 (78)	
1	16 (37)	14 (52)	7 (47)	2 (33)	4 (22)	
Naviko ląstelių, kuriuose nustatyta baltymų raiška, procentai skaitmeninės analizės duomenimis (vidurkis ± standartinis nuokrypis)						
ER	80 ± 13	62 ± 33	52 ± 26	2 ± 1	4 ± 7	<0,0001
PR	53 ± 31	38 ± 36	19 ± 29	2 ± 2	3 ± 4	<0,0001
AR	47 ± 20	32 ± 23	28 ± 21	33 ± 15	10 ± 15	<0,0001
BCL2	56 ± 11	46 ± 24	33 ± 27	7 ± 6	18 ± 15	<0,0001
HER2	7 ± 11	7 ± 12	37 ± 25	64 ± 19	1 ± 3	<0,0001
Ki67	14 ± 7	40 ± 17	22 ± 12	31 ± 15	53 ± 16	<0,0001
p53	13 ± 16	34 ± 32	19 ± 18	17 ± 26	44 ± 35	
p16	14 ± 8	14 ± 12	14 ± 7	10 ± 4	40 ± 21	<0,0001
HIF1α	9 ± 6	12 ± 10	12 ± 10	18 ± 13	18 ± 10	<0,005
SATB1	12 ± 7	14 ± 10	13 ± 10	10 ± 4	19 ± 18	

T – pirminis navikas (T1 – navikas ≤ 2 cm, T2 – navikas > 2 cm, < 5 cm); N – regioninės metastazės (N0 – regioniniai limfmazgiai nepažeisti, N1 – metastazės 1-3 regioniniuose limfmazgiuose, N2 – metastazės 4–9 regioniniuose limfmazgiuose, N3 – metastazės 10 ir daugiau regioninių limfmazgių); G – naviko diferenciacijos laipsnis (G1 – gerai diferencijuotas, G2 – vidutiniškai diferencijuotas, G3 – blogai diferencijuotas) naviko biologinis tipas: LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, LB HER2+ – luminalinis B HER2+, HER2+ – ne luminalinis HER2+, TN – trejopai neigiamas, ER – estrogenų receptoriai, PR – progesteronų receptoriai, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriai 2, AR – androgenų receptoriai, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53, p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1α – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys.

**13 lentelė. Baltymų raiškos pirminių verčių koreliacijos rezultatai**

	ER	PR	AR	BCL2	HER2	Ki67	p53	p16	HIF1 $\alpha$	SATB1
ER	1,0000									
PR	0,5562	1,0000								
AR	0,5651	0,6199	1,0000							
BCL2	0,6950	0,5159	0,4403	1,0000						
HER2	0,0148	-,2411	-,0097	-,1898	1,0000					
Ki67	-,5022	-,3644	-,4497	-,3804	-,1313	1,0000				
p53	-,1546	-,0204	-,0731	-,2154	0,0602	0,1930	1,0000			
p16	-,2583	-,2016	-,1513	-,1058	-,0619	0,1363	0,0264	1,0000		
HIF1 $\alpha$	-,4606	-,4763	-,5118	-,4665	0,0130	0,3136	0,0245	0,1499	1,0000	
SATB1	-,2651	-,2065	-,3727	-,2572	-,0253	0,0877	0,1345	0,0749	0,5159	1,0000

ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53 ir p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys.

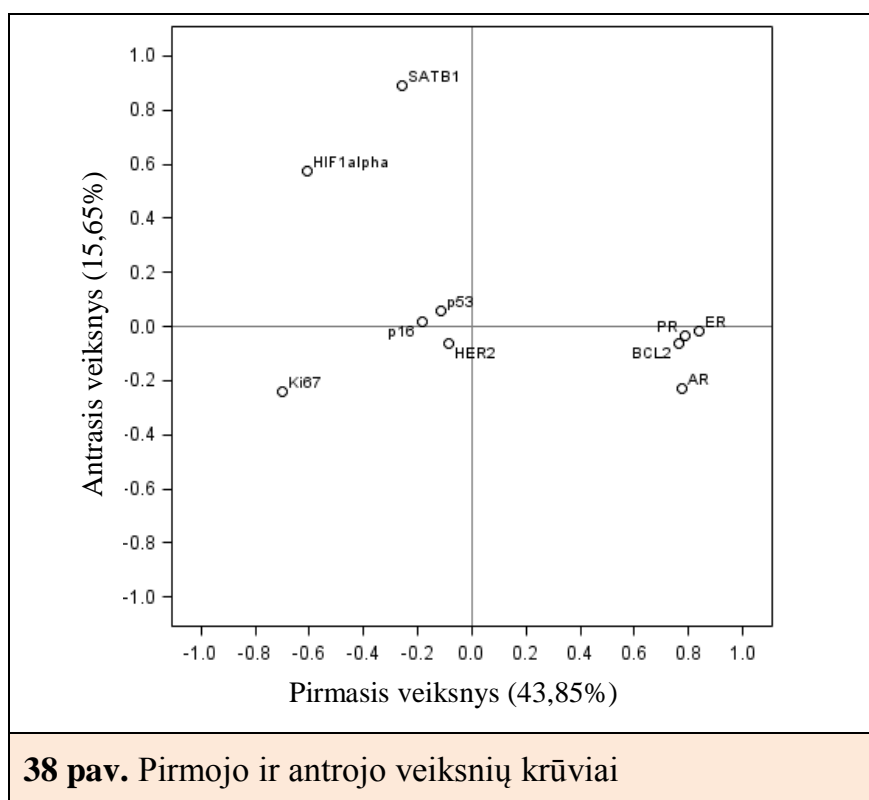
Remiantis minimalia savąja verte 0,84, išskirti 5 veiksniai, atlikta šių veiksnių rotacija *ortomax* metodu. Rotuotų veiksnių struktūra ir kiekvieno veiksnio įtaka variacijoms pateikta 14 lentelėje. Šie penki veiksniai visi kartu paaiškino 80% duomenų rinkinio variacijų.

**14 lentelė. Rotuotų veiksnių imunofenotipas krūties duktalinėje karcinomoje**

	Pirmasis veiksnys	Antrasis veiksnys	Trečiasis veiksnys	Ketvirtasis veiksnys	Penktasis veiksnys
ER	0,83941	-0,01623	0,06273	-0,10947	-0,13607
PR	0,78891	-0,03484	-0,28622	0,17900	-0,09682
AR	0,77439	-0,22905	0,06032	0,10351	0,00616
BCL2	0,76608	-0,06227	-0,21251	-0,21011	0,03420
HER2	-0,08421	-0,06469	0,93842	0,05171	-0,05224
Ki67	-0,70211	-0,23907	-0,38056	0,18840	-0,04474
p53	-0,11614	0,05720	0,03361	0,95603	0,00840
p16	-0,18339	0,01554	-0,04829	0,00668	0,97677
HIF1 $\alpha$	-0,61104	0,57686	-0,04245	-0,11539	0,02041
SATB1	-0,25600	0,89064	-0,03403	0,11291	0,00695

ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53 ir p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys.

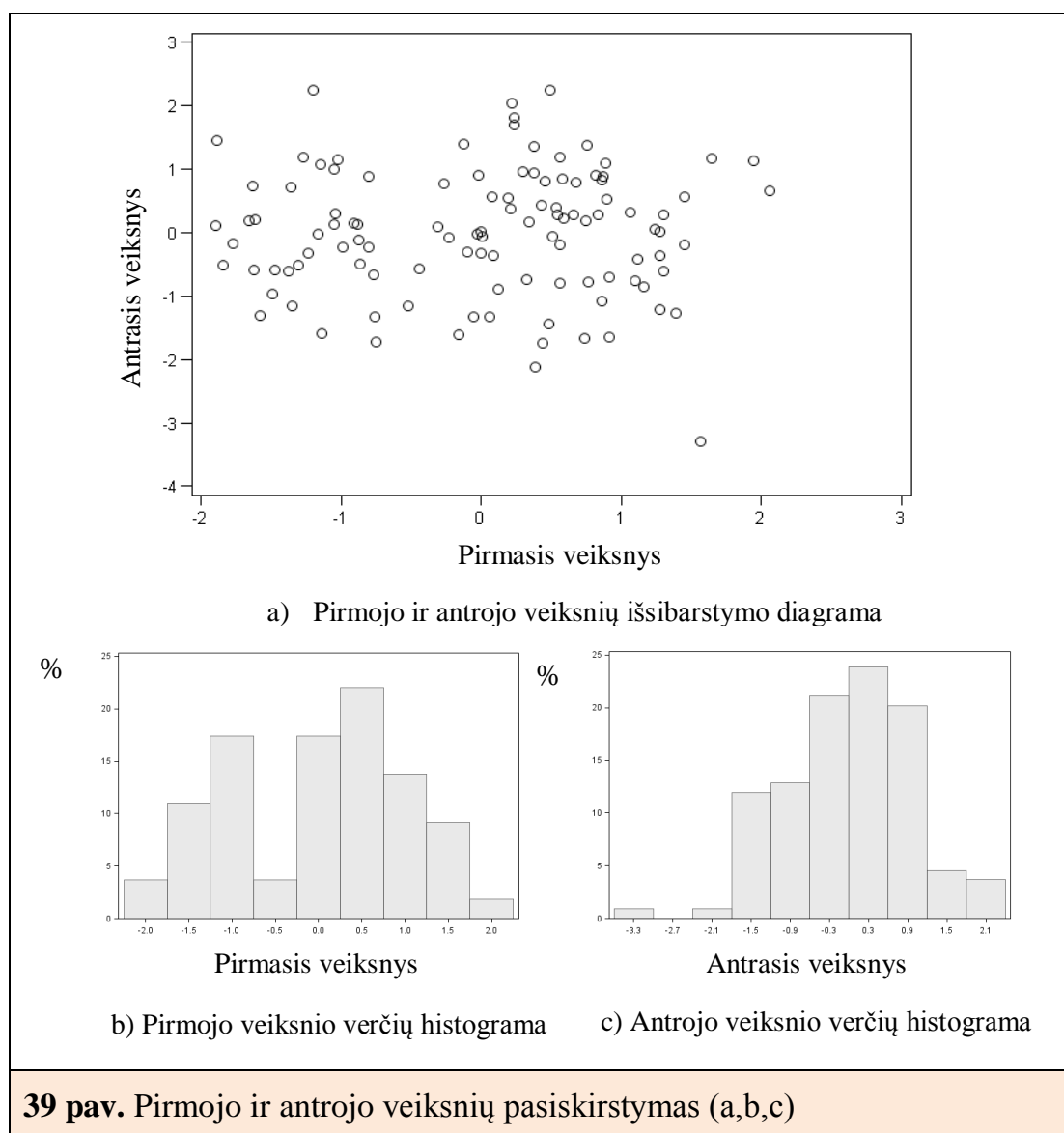
Pirmasis ir antrasis veiksniai paaiškino didžiąją dalį penkių veiksmų variacijų (atitinkamai 43,9% ir 15,7%). Pirmojo ir antrojo veiksmo krūviai (pirminių duomenų įtaka) pateikti 38 paveiksle. Pirmąjį veiksnį apibūdina stiprūs teigiami hormonų receptorių (ER, PR, AR) ir BCL2 bei stiprūs neigiami – Ki67 ir HIF1 $\alpha$  krūviai. Remiantis biologine ir prognozinė šių žymenų informacija, gauta tiriant krūties karcinomų mėginius, bei mūsų tyrime nustatyta statistiškai reikšmingu ryšiu su naviko diferenciacijos laipsniu, šis pirmasis veiksnys interpretuotas kaip naviko „IHC metodu nustatyta diferenciacijos laipsnis“ (i-G): navikai, kuriuose vyrauja hormonų receptorių ir BCL2 raiška – mažo IHC diferenciacijos laipsnio (i-G-mažas) ir navikai, kuriuose vyrauja Ki67 ir HIF1 $\alpha$  raiška – didelio IHC diferenciacijos laipsnio (i-G-didelis). Antrasis veiksnys, teigiamai susijęs su SATB1 ir HIF1 $\alpha$  raiška (veiksmo krūviai atitinkamai 0,89 ir 0,58), pavadintas SATB1/HIF1 $\alpha$  (38 pav.).



**38 pav.** Pirmojo ir antrojo veiksmų krūviai

ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53, p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys.

Pirmojo ir antrojo veiksnų vertės (39a pav.) pateiktos atitinkamose histogramose (39b ir 39c pav.). Histogramose matomas bimodalinis pirmojo veiksnio (i-G) ir normalus antrojo veiksnio (SATB1/HIF1 $\alpha$ ) verčių pasiskirstymas. Atitinkamai mėginių grupės heterogeniškumas pasireiškia ir išsibarstymo diagramoje (39a pav.). Atsižvelgus į kliniškes ir patologines navikų charakteristikas, tiriamieji mėginiai padalyti į kelias i-G grupes: mažo IHC diferenciacijos laipsnio – i-G-mažas (pirmojo veiksnio vertė > -0,5) ir didelio IHC diferenciacijos laipsnio – i-G-didelis (pirmojo veiksnio vertė  $\leq$  -0,5) ir kelias SATB1/HIF1 $\alpha$  grupes: SATB1/HIF1 $\alpha$ -mažas (2-ojo veiksnio vertė  $\leq$ 0) ir SATB1/HIF1 $\alpha$ -didelis (antrojo veiksnio vertė >0).



Trečiasis, ketvirtasis ir penktasis veiksniai kartu sudarė likusią dalį (40,5%) variacijų (atitinkamai 14,6%, 13,5% ir 12,4%). Šie veiksniai išsiskyrė stipriais teigiamais vieno žymens krūviais ir atitinkamai pavadinti: trečiasis veiksnys – HER2, ketvirtasis veiksnys – p53 ir penktasis veiksnys – p16. Šių veiksmių verčių pasiskirstymas buvo normalus.

#### 4.6. Imunohistocheminių žymenų derinių sąsajos su krūties duktalinės karcinomos charakteristikomis

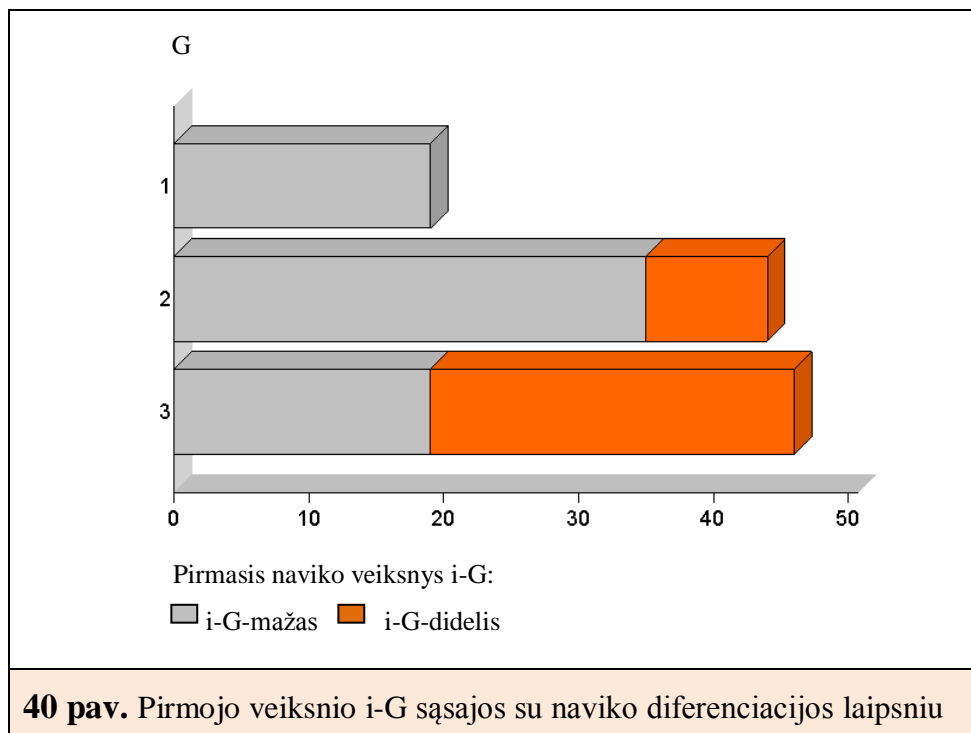
Ištirtos penkių veiksmių, išskirtų iš atrinktų IHC žymenų derinių sąsajos su kitais įprastiniais krūties duktalinės karcinomos parametrais: biologiniu subtipu, diferenciacijos laipsniu (G), naviko stadija (T), limfmazgių būkle (N) ir HER2 statusu (15 lentelė).

<b>15 lentelė. Penkių veiksmių sąsajos su įprastinėmis krūties duktalinės karcinomos charakteristikomis</b>						
	n	i-G -didelis	SATB1/ HIF1α -didelis	HER2 -didelis	p53 -didelis	p16 -didelis
Tiriamoji grupė	109					
Amžiaus grupė				p<0,03	p<0,003	
1 < 55 m. (n=52)	52	19 (37)	28 (54)	20 (38)	39 (75)	28 (54)
2 > 55 m. (n=57)	57	17 (30)	29 (51)	34 (60)	27 (47)	30 (53)
G		p<0,00001				
1	19	0 (0)	12 (63)	10 (53)	7 (37)	12 (63)
2	44	9 (21)	26 (59)	27 (61)	30 (68)	22 (50)
3	46	27 (59)	19 (41)	17 (37)	29 (63)	24 (52)
T						
1	58	16 (28)	31 (53)	33 (57)	37 (64)	27 (47)
2	51	20 (44)	26 (51)	21 (41)	29 (57)	31 (61)
N						
0	66	25 (38)	36 (55)	30 (45)	40 (61)	35 (53)
1	43	11 (26)	21 (49)	24 (56)	26 (60)	23 (53)
Biologinis naviko subtipas		p<0,0001		p<0,00001		p<0,002
LA	43	0 (0)	29 (67)	25 (58)	23 (53)	26 (60)
LB	27	7 (26)	10 (37)	10 (37)	19 (70)	8 (30)
LB HER2+	15	6 (40)	7 (47)	12 (80)	10 (67)	8 (53)
HER2+	6	6 (100)	2 (33)	6 (100)	2 (33)	1 (17)
TN	18	17 (94)	9 (50)	1 (6)	12 (67)	15 (83)

T – pirminis navikas (T1 – navikas ≤ 2 cm, T2 – navikas > 2 cm, < 5 cm); N – regioninės metastazės (N0 – regioniniai limfmazgiai nepažeisti, N1 – metastazės 1–3 regioniniuose limfmazgiuose, N2 – metastazės 4–9 regioniniuose limfmazgiuose, N3 – metastazės 10 ir daugiau regioninių limfmazgių); G – naviko diferenciacijos laipsnis (G1 – gerai diferencijuotas, G2 – vidutiniškai diferencijuotas, G3 – blogai diferencijuotas) naviko biologinis tipas: LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, LB HER2+ – luminalinis B HER2+ , HER2+ – ne luminalinis HER2+, TN – trejopai neigiamas.

Pirmasis naviko veiksnys i-G buvo susijęs su naviko biologiniu tipu ( $p < 0,0001$ ): visi HER2 teigiami ( $n=6$ ) ir 94 % ( $n=17$ ) TN krūties duktalinės karcinomos atvejai bei didelė luminalinio B (11/31, 35,5%) ir luminalinio B HER2+ (10/17, 58,8%) dalis pateko į i-G-didelis navikų kategoriją. Tuo tarpu luminalinio A tipo navikai ( $n=43$ ) į šią navikų kategoriją nepateko.

Pirmasis naviko veiksnys i-G buvo glaudžiai susijęs su diferenciacijos laipsniu ( $p < 0,0001$ , 40 pav.): visi G1 atvejai buvo i-G-mažas ( $n=19$ ), dalis G2 ir didžioji dalis G3 atvejų buvo i-G-didelis (atitinkamai 21% ir 58%). i-G naviko veiksnys nebuvo statistiškai reikšmingai susijęs su pacientų amžiumi, naviko stadija bei limfmazgių būkle.

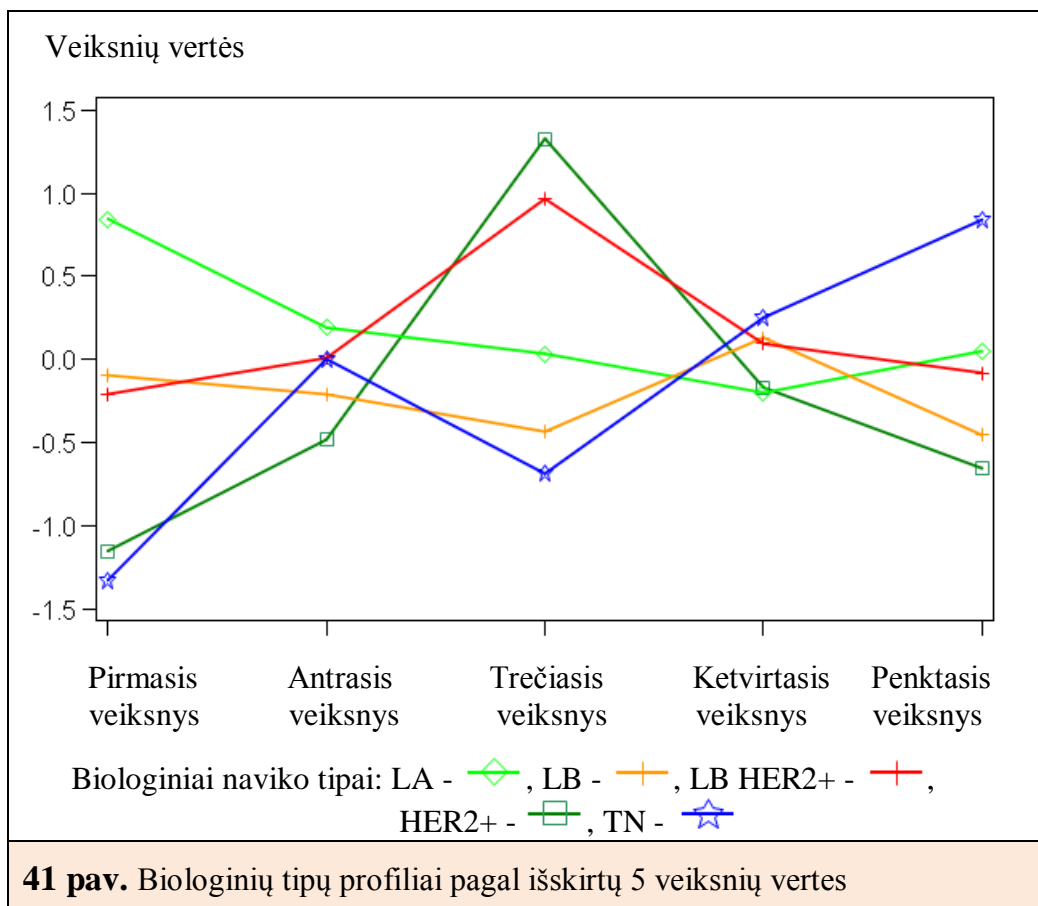


Trečiasis veiksnys (HER2) buvo statistiškai patikimai susijęs su vyresnio amžiaus pacientų grupe ir atitinkamai su naviko biologiniu tipu (15 lentelė).

Svarbu tai, kad reikšminga dalis luminalinio A ir luminalinio B tipo navikų bei vienas TN tipo navikų atvejais buvo HER2-G-didelis kategorijos, kas susiję su santykinai mažos HER2 teigiamos raiškos ribinės vertės parinkimu dichotomizuojant veiksnių vertes.

Penktojo veiksnio (p16) aukštesnės raiškos vertės dominavo TN tipo navikų atvejais (83%). Antrojo (SATB1/HIF1 $\alpha$ ) ir ketvirtojo (p53) veiksnių sąsajų su įprastinėmis krūties duktalinės karcinomos charakteristikomis nenustatyta (15 lentelė).

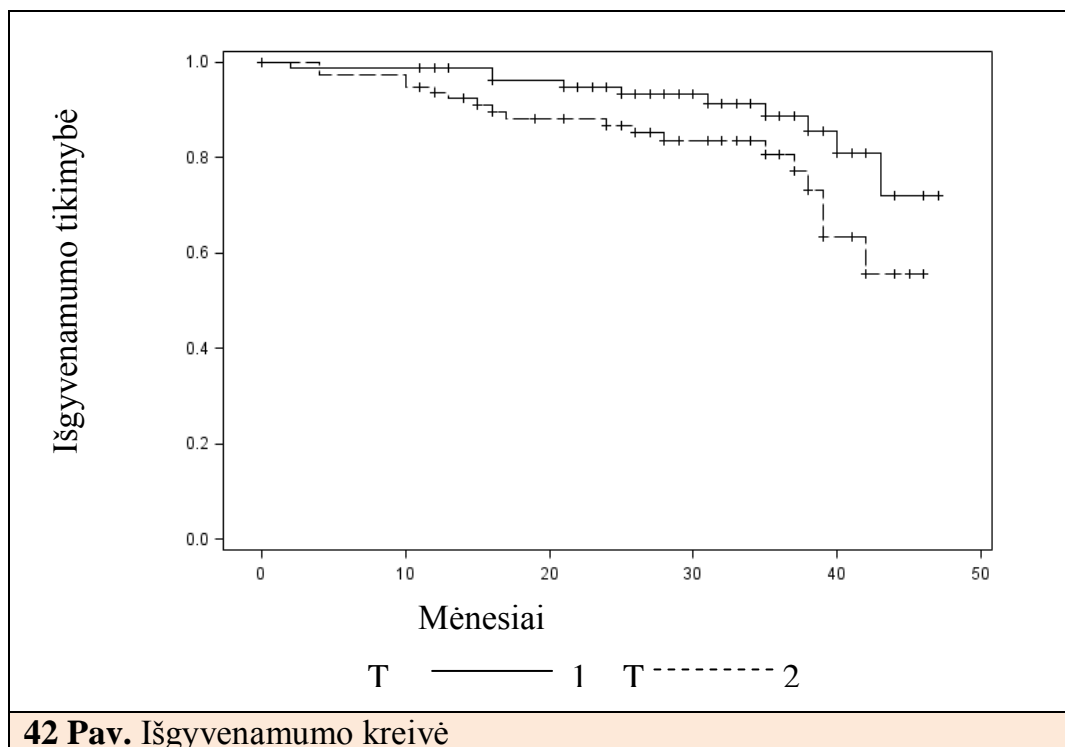
IHC biologinių tipų profilis analizuotas vienmatės variacijos analizės (ANOVA) metodu, veiksnių vertes naudojant kaip priklausomus kintamuosius. Šios analizės būdu nustatyti IHC profiliai pateikti 41 paveiksle.



Naviko biologinis tipas: LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, LB HER2+ –luminalinis B HER2+, HER2+ – ne luminalinis HER2+, TN – trejopai neigiamas. Pateikti veiksnių verčių vidurkiai, nustatyti variacijų analizės (ANOVA) būdu.

Nustatytas statistiškai reikšmingas ( $p < 0.0001$ ) pirmojo, trečiojo ir penktojo veiksnių ANOVA analizės modelis. Pažymėtina, kad (1) luminalinio A, (2) luminalinio B su luminalinio B HER2+ ir (3) HER2+ su TN tipų navikai sudaro tris atskirus pirmojo veiksnio pogrupius (nustatytas statistiškai reikšmingas šių grupių porinis palyginimas). Trečiojo veiksnio (HER2) pasiskirstymas atitiko apibrėžtus biologinius tipus, nors luminalinio A tipo navikai turėjo šiek tiek didesnes veiksnių vertes nei luminalinio B tipo navikai (atlikus porinį šių grupių palyginimą, statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta). Penktasis veiksnys (p16) iš kitų veiksnių išsiskyrė ženkliai didesnėmis veiksnio reikšmėmis TN tipo navikų kategorijoje ( $p < 0,05$ ). Porinė p16 variacijos palyginimo analizė rodo tuos pačius statistiškai reikšmingus skirtumus (12 lentelė).

Perspektyviai buvo renkami duomenys apie tolesnę ligos eigą registruojant ligos recidyvo ir paciento mirties įvykius. Iš viso surinkta 200 pacienčių duomenys apie ligos eigą. Vidutinė stebėjimo trukmė buvo 34 mėn. (nuo 11 iki 44 mėn.). Stebėjimo laikotarpiu liga recidyvavo 29 pacientėms, mirė 15.



T – pirminis navikas (T1 – navikas  $\leq 2$  cm, T2 – navikas  $> 2$  cm,  $< 5$  cm)



Atlikta Kaplano-Meierio ir Coxo regresijos analizė naudojant klinikos, patologijos, IHC ir molekulinį žymenų rinkinius, leido nustatyti tik patikimą naviko stadijos (T) įtaką išgyvenamumui nesant recidyvo: T2 stadija buvo susijusi su blogesne prognoze (42 pav.,  $p < 0,05$ ). Kitų patikimų prognozinį požymių nustatyti nepavyko dėl santykinai trumpos stebėjimo trukmės ir nedidelio recidyvų dažnio ankstyvosios duktalinės krūties karcinomos pacienčių grupėje. Tirtų pacienčių stebėsena yra tęsiama.

#### **4.7. Krūties duktalinių karcinomų, turinčių hormonų receptorių raišką, imunofenotipo faktorinė analizė**

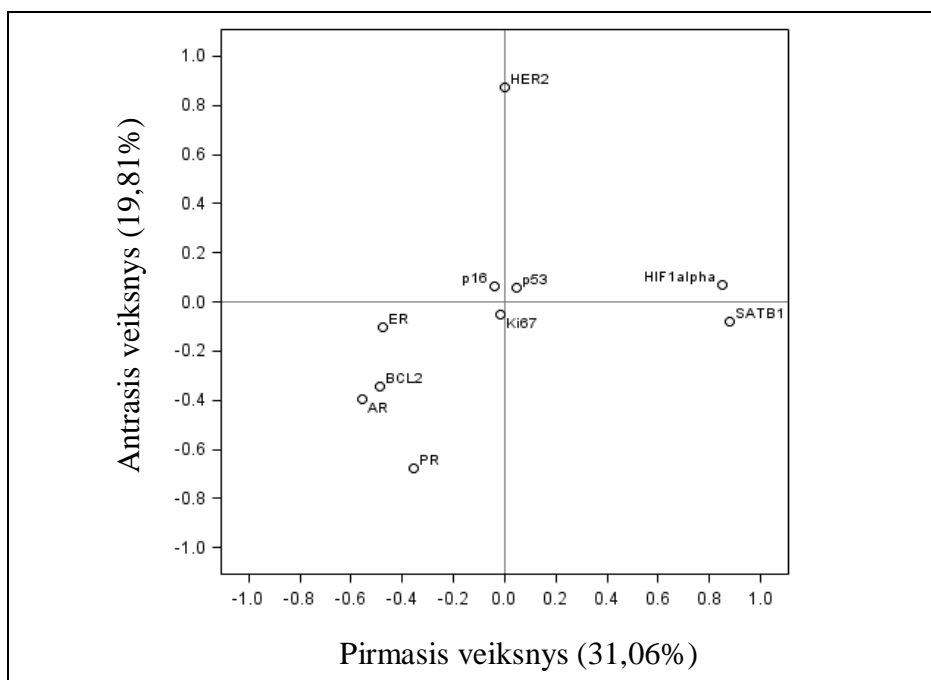
HR+ navikų imunofenotipo analizė atlikta analizuojant 85 pacienčių luminalinio A, luminalinio B ir luminalinio B HER2+ tipo navikų mėginius. Rotuotų veiksnių struktūra pateikta 15 lentelėje.

**15 lentelė.** Krūties duktalinės karcinomos grupės, turinčios hormonų receptorių raišką, rotuotų veiksnių struktūra

	Pirmasis veiksny	Antrasis veiksny	Trečiasis veiksny	Ketvirtasis veiksny	Penktasis veiksny
ER	-0,47598	-0,10090	-0,60245	-0,10337	-0,16151
PR	-0,35541	-0,67714	-0,31955	0,29194	0,00229
AR	-0,55499	-0,39729	-0,39127	0,24653	0,27274
BCL2	-0,48636	-0,34242	-0,31599	-0,38459	-0,01865
HER2	0,00251	0,87192	-0,15417	0,25187	0,08731
Ki67	-0,01734	-0,04969	0,82934	0,10271	-0,15723
p53	0,04843	0,05677	0,12929	0,88141	-0,12610
p16	-0,03786	0,06404	-0,09880	-0,12972	0,95100
HIF1 $\alpha$	0,84950	0,06950	0,12918	-0,09585	0,05170
SATB1	0,87715	-0,08281	-0,20321	0,16228	-0,07999

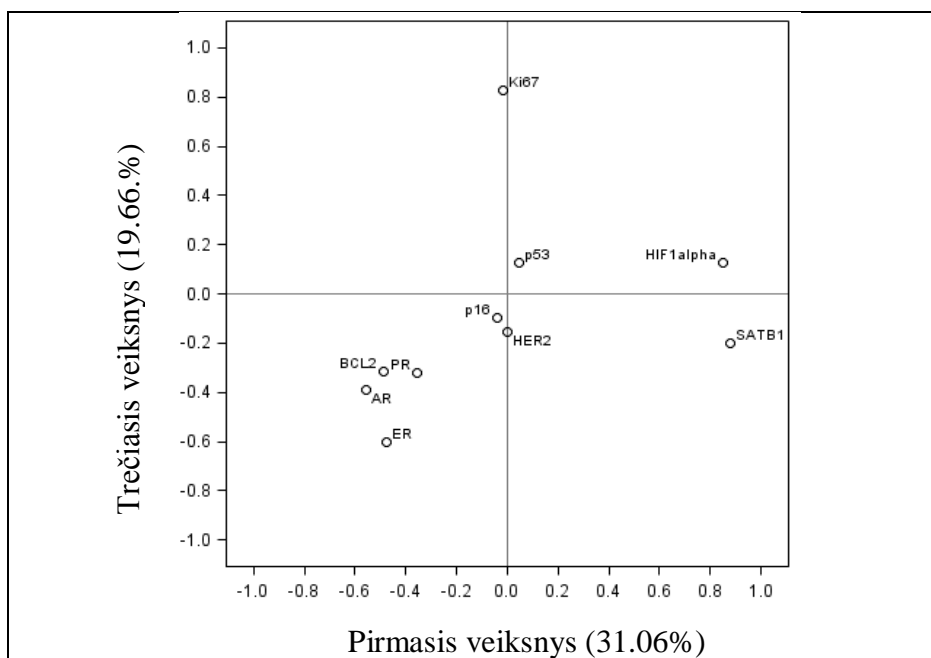
ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53 ir p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksny, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksny. Pateikta nustatytų veiksnių krūvių struktūra.

Pirmojo ir antrojo veiksnio krūviai pateikti 43 ir 44 paveiksluose. Visi penki šie veiksniai kartu paaiškino 77% duomenų rinkinio variacijų.



**43 pav.** Krūties duktalinių karcinomų, turinčių hormonų receptorių raišką, rotuotų veiksmių struktūra: pirmojo ir antrojo veiksmių krūviai

ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53 ir p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys.



**44 pav.** Krūties duktalinių karcinomų, turinčių hormonų receptorių raišką, rotuotų veiksmių struktūra: pirmojo ir trečiojo veiksmių krūviai

ER – estrogenų receptorius, PR – progesteronų receptorius, HER2 – žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptorius 2, AR – androgenų receptorius, Ki67 – ląstelių proliferacijos žymuo, p53 ir p16 – vėžio supresoriai, BCL2 – apoptozę slopinantis baltymas, SATB1 – transkripcijos veiksnys, HIF1 $\alpha$  – atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys.

Pirmasis veiksnys (31,1% variacijų) buvo panašus į antrąjį veiksni (SATB1/HIF1 $\alpha$ ) visoje tirtų pacientų grupėje, tačiau veiksnio struktūra - skirtinga: šį veiksni charakterizuoja stiprūs teigiami HIF1 $\alpha$  krūviai, identiški SATB1 ir vidutiškai neigiami AR, ER ir BCL2 krūviai. Ši veiksnio struktūra rodo atvirkštinį ryšį tarp SATB1 ir HIF1 $\alpha$  bendrosios raiškos ir AR, ER ir BCL2 bendrosios raiškos HR+ krūties duktalinės karcinomos mėginiuose. Kadangi biologinė šio reiškinio prasmė nėra aiški, veiksnys pavadintas “SATB1/HIF1 $\alpha$ -AR/ER/BCL2”.

Antrasis ir trečiasis veiksniai vienodomis dalimis paaiškino turimo duomenų rinkinio variacijas (atitinkamai 19,8 ir 19,7%). Antrasis veiksnys charakterizuojamas teigiamu HER2 (0,87) ir neigiamu PR (-0,68) krūviais, o trečiasis veiksnys – teigiamu Ki67 (0,83) ir neigiamu ER (-0,60) krūviais. Atitinkamai šie veiksniai buvo pavadinti HER2-PR ir Ki67-ER.

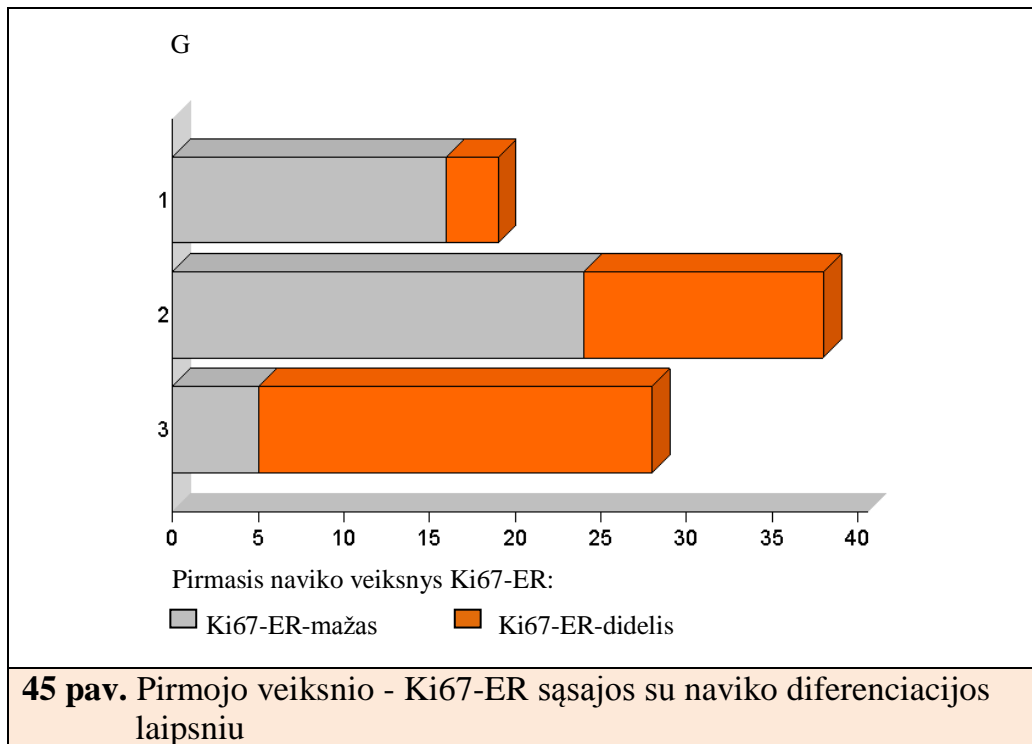
Ketvirtasis (p53) ir penktasis (p16) veiksniai buvo panašūs į anksčiau nustatytus veiksnius visoje tirtų mėginių grupėje ir paaiškino atitinkamai 15,7 ir 13,8% duomenų rinkinio skirtumus.

Visų veiksnių vertės turėjo normalų pasiskirstymą ir buvo dichotomizuotos ties 0 ribine verte.

#### **4.8. Krūties duktalinių karcinomų, turinčių hormonų receptorių raišką, atrinktų imunohistocheminių žymenų derinių sąsajos su krūties duktalinės karcinomos charakteristikomis**

Pirmasis naviko veiksnys (SATB1/HIF1 $\alpha$ -AR/ER/BCL2) nebuvo susijęs nei su pacientų amžiaus grupėmis, nei su T, N, G, nei su biologiniais naviko tipais (14 lentelė). Antrasis veiksnys (HER2-PR-didelis) verčių kategorijoje buvo susijęs su vyresnių pacienčių amžiaus grupe ( $p < 0,002$ ) ir biologiniu naviko tipu ( $p < 0,05$ ).

Trečiasis veiksnys (Ki67-ER) buvo panašus į pirmąjį veiksnį (i-G) visoje tirtų mėginių: didelės vertės buvo susijusios su naviko diferenciacijos laipsniu ( $p < 0,0001$ , 45 pav.) ir dažniau nustatytas luminalinio B navikų tipo mėginiuose ( $p < 0,0001$ ). Pažymėtina, kad kai kurie Ki67-ER-didelis grupės navikai buvo aptinkami ir G1 (3/19, 16%), ir luminalinio A (9/43, 21%) navikų kategorijose.

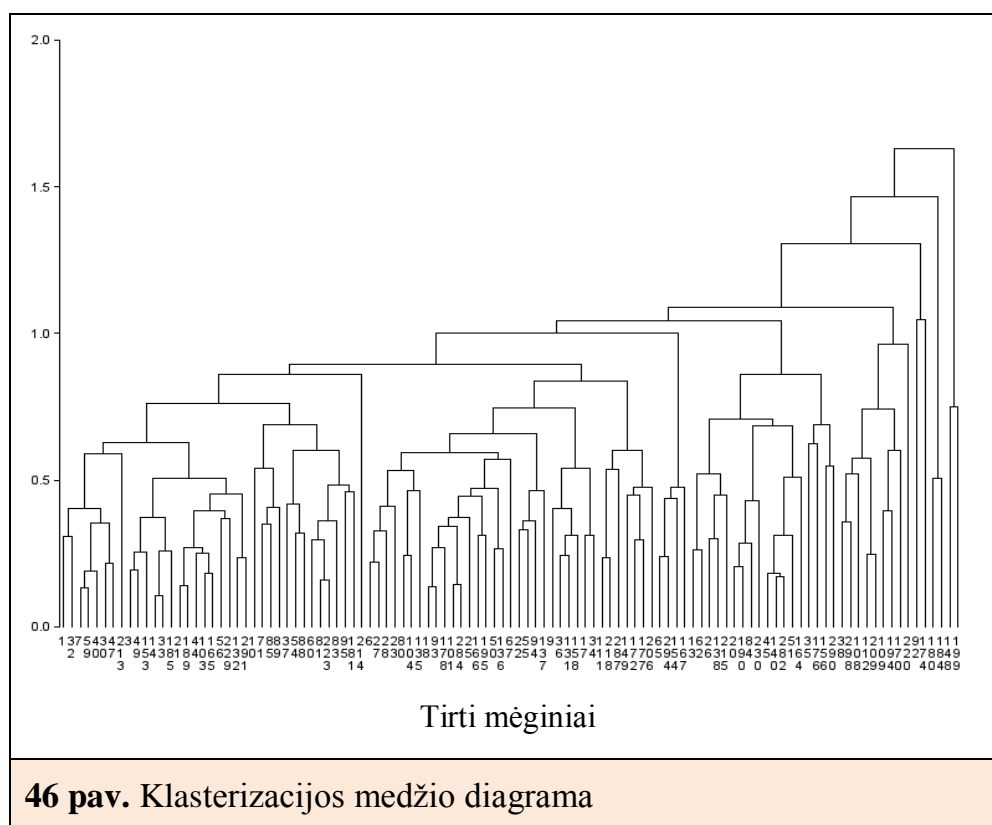


#### 4.9. Krūties duktalinės karcinomos imunofenotipo klasterinė analizė ir pagrindinių klasterių charakteristikos

Klasterinė analizė buvo atlikta vidurkio sąsajų metodu klasterizuojant faktorinės analizės metu išskirtų penkių veiksnių verčių erdvėje. Klasterizacijos medžio diagrama pateikta 46 pav.

Išskyrus 10 klasterių, didžioji dalis navikų pateko į 3 pagrindinius klasterius. Išskirtų klasterių palyginimas su biologiniais tipais (16 lentelė) parodė, kad 1-ame klasteryje ( $n=37$ ) dominavo luminalinio A tipo navikai (15/37, 41%), tačiau buvo nemažai ir luminalinio B HER2+ tipo atvejų (10/37,

27%). 2-ąjį klasterį (n=35) sudarė daugiausia luminalinio A (22/35, 61%) ir luminalinio B tipo navikai (10/35, 29%). 3-asis klasteris (n=18) buvo beveik išimtinai iš TN navikų (16/18, 89%). Likusius negausius 7 klasterius sudarė daugiausia luminalinio B ir luminalinio A tipų navikai (19/109, 17%).



**16 lentelė. Klasterių palyginimas su naviko biologiniais tipais**

Klasteris	LA n (%)	LB n (%)	LB HER2+ n (%)	HER2+ n (%)	TN n (%)	n
1	15 (40)	6 (16)	10 (27)	5 (14)	1 (3)	37
2	22 (63)	10 (28)	3 (9)	0 (0)	0 (0)	35
3	0 (0)	2 (11)	0 (0)	0 (0)	16 (89)	18
4	3 (75)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	4
5	2 (25)	4 (50)	1 (12)	0 (0)	1 (13)	8
6	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2
7	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2
8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
9	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
10	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1

Naviko biologinis tipas: LA – luminalinis A, LB – luminalinis B, LB HER2+ – luminalinis B HER2+, HER2+ – ne luminalinis HER2+, TN – trejopai neigiamas.

Pagrindinių klasterių ir biologinių tipų atitikimas buvo esminis, nors ir neabsoliutus. Ši sąsaja tarp skaitmeninės IHC analizės duomenų ir krūties karcinomos biologinių tipų patvirtina daugiamačės IHC analizės galimybes krūties vėžio heterogeniškumui tyrinėti. Tačiau kadangi didžioji mėginių dalis yra HR+ navikų (luminalinio A ir luminalinio B tipų) mėginiai, matome, kad atlikti išsamiai analizei reikalinga didesnė mėginių imtis. Dėl šios priežasties turima mėginių imtis toliau analizuota nebuvo.

## 5. REZULTATŲ APTARIMAS

Krūties duktalinėje karcinomoje tyrėme baltymų raišką (ER, PR, AR, HER2, Ki67, SATB1, BCL2, HIF $\alpha$ , p16, p53) IHC metodu, HER2 geno raišką vertinome FISH metodu, genetines (*TP53*, *HER2*) ir epigenetines (*ESR-1*, *p14*, *p16*, *RARB*, *RASSF1*, *DAPK1*, *GSTP1*, *MGMT*) genų pažaidas analizavome sekoskaitos, DNR grandinės konformacijos, metilinimui jautrios PGR ir bisulfitinės sekoskaitos tyrimo metodais. Baltymų raiška vertinta patologo vizualiai ir skaitmeninės vaizdo analizės metodu, o gauti kiekybiniai IHC žymenų duomenys analizuoti daugiamačės statistinės analizės metodais. Visų atliktų analizių rezultatai palyginti atsižvelgiant į atskirus krūties vėžio biologinius tipus. Nustatytos statistiškai reikšmingos sąsajos tarp biologinio naviko tipo ir ligos stadijos ( $p < 0,00002$ ), naviko diferenciacijos laipsnio ( $p < 0,0001$ ) ir metastazių sritiniuose limfmazgiuose ( $p < 0,0002$ ), IHC žymenų, išskyrus p53, raiška buvo statistiškai reikšmingai susijusi su biologiniu krūties naviko tipu ( $p < 0,05$ ). Darbe nustatyti statistiškai reikšmingi biologinių žymenų tarpusavio ryšiai, atskleistos naujos įžvalgos apie krūties vėžio biologiją bei naviko heterogeniškumą.

Iki šiol pripažinti ir kasdieninėje praktikoje rekomenduojami tik keli ankstyvajam krūties vėžiui gydyti svarbūs biologiniai žymenys, turintys patikimą prognozinę vertę – tai ER, PR ir HER2. Nuo 2011 metų, parenkant

individualizuotą krūties vėžio gydymą, rekomenduojama atsižvelgti į naviko proliferacijos laipsnį (Ki67) [18]. Šiuo metu jau aišku, kad, siekiant anksti diagnozuoti onkologinę ligą, parinkti tinkamas gydymo strategijas ir prognozuoti ligos eigą, būtini nauji molekuliniai krūties vėžio biologiniai žymenys [25, 72, 147-150].

Pastaruosiu metu atlikta daug tyrimų, kuriuose analizuojamos sąsajos tarp krūties vėžio biologinių tipų ir ligos prognozės [23, 151, 152], genetinių pokyčių [153] bei atsako į terapiją [154, 155]. Tyrimai, kuriuose detalai analizuotas biologinis navikinio audinio profilis, išimtinai atlikti naudojant DNR/RNR mikrogardelių (angl. *microarrays*) technologiją, kuri iki šiol dėl tiriamojo mėginio paruošimo sudėtingumo vis dar retai naudojama klinikinėje praktikoje [156, 157]. Savo darbe navikinio audinio profilį analizavome derindami plačiai klinikinėje praktikoje taikomas technologijas (IHC, FISH tyrimai) su naujais tyrimo metodais (audinių mikrogardelių, skaitmeninio vaizdo, genetinių ir epigenetinių pažeidimų analizės).

Mažesnėje duktalinių karcinomų grupėje (n=106) tirti DNR metilinimo pakitimai genų promotorinėse sekose, analizuoti dažniausiai mutuojantys *TP53* egzonai (nuo penkto iki devinto imtinai). Dažniausiai hipermetilinami genai duktalinėse krūties karcinomose buvo *RASSF1* ir *ESR1*, nustatytas jų hipermetilinimo dažnis didesnis kaip 50 procentų. Kiek rečiau buvo hipermetilinami genų *MGMT*, *RARB*, *GSTP1* ir *DAPK1* promotoriai, pakitimų dažnis buvo apie 20% atvejų. Epigenetinis geno *RASSF1* nutildymas yra vienas iš dažniausių molekulinų pakitimų krūties karcinomose. Geno hipermetilinimo dažniai, apie kurių nustatymą skelbta įvairiose publikacijose, svyruoja nuo 42 iki 85 procentų [127, 128, 131, 158, 159]. Mūsų tyrime *RASSF1* hipermetilinimas statistiškai reikšmingai koreliavo su naviko ląstelių diferenciacija. Estrogenų receptoriaus geno (*ESR1*) raiškos pakitimas krūties karcinomose – taip pat dažnas molekulinis pakitimas. Raiškos variacijas sąlygoja daugelis veiksnių, tarp jų ir promotorinių sekų metilinimas. *ESR1* promotorius – sudėtinga struktūra, o geno raiškai reikšmingiausios CpG salos iki šiol nėra išsamiai ištirtos. Atliekant mūsų tyrimą analizuoti du *ESR1*

promotoriaus fragmentai, tačiau tik *ESR1-4* sekos hipermetilinimas statistiškai reikšmingai koreliavo su estrogenų receptoriaus raiška ir buvo būdingas luminalinio tipo navikams. Su biologiniais krūties navikų tipais statistiškai reikšmingai koreliavo genų *ESR1-4* ir *p16* hipermetilinimas bei geno *TP53* mutacijos. Geno *TP53* mutacijų dažniai buvo didžiausi tarp TN kategorijos navikų. Epigenetinių pažeidimų analizė atskleidė naujas biologinių krūties navikų tipų charakteristikas ir parodė epigenetinių pažeidimų svarbą vertinant ligos eigą.

Įvertinome geno *TP53* mutacijų krūties duktalinės karcinomos mėginiuose dažnį. Nors mutacijų dažnis nebuvo ypač didelis (28%), tačiau mutacijos statistiškai reikšmingai koreliavo su IHC tyrimu nustatyta baltymo p53 raiška, siejosi su ER ir Ki67 baltymų raiška bei su naviko diferenciacijos laipsniu.

Analizuodami krūties duktalinės karcinomos mėginius, sudėtus į audinių mikrogardeles tam, kad įvertintume dešimties IHC žymenų raišką, atlikome skaitmeninių vaizdų analizę, kuri leido patikimai išskirti navikų biologinius tipus ir suteikė papildomos informacijos apie šių tipų navikų biologinę elgseną. Skaitmeninė analizė, kitaip nei įprastinis patologo vizualus vertinimas, leidžia IHC žymenų raišką išmatuoti kiekybiniais parametrais. Tai iš esmės nauja technologija, suteikianti papildomų galimybių detalčiau apibūdinti konkrečių žymenų raišką ir įvertinti jų tarpusavio sąsajas. Objektyvus žymenų kiekybinis įvertinimas skaitmeninės vaizdų analizės būdu yra esminis žingsnis individualizuojant krūties vėžio gydymą.

Gautas kiekybines skaitmeninės analizės vertes lyginome su įprastiniu patologo vertinimu bei stereologiniu ir FISH tyrimo metodu nustatytu tiesos kriterijumi, kitaip „aukso standartu“. Skaitmeninė analizė labai stipriai koreliavo su stereologiniame tyrime dalyvavusių visų trijų tyrėjų vertinimais ( $r=0,95$ ) ir kiek silpniau su patologo vertinimu ( $r=0,86$ ). Visų tirtų IHC žymenų skaitmeninės analizės ir įprastinio patologo vertinimo koreliacija labai stipri. Iš esmės mūsų tyrime atliktos skaitmeninės analizės rezultatų sutapimas su įprastiniu vizualiu patologo vertinimu vienas didžiausių, palyginti su kitų tyrėjų publikuotais duomenimis [31, 32, 35, 36, 160-163].



Kaip kituose tyrimuose [32, 160, 161], taip ir mūsų darbe HER2 žymens skaitmeninės IHC analizės ir FISH tyrimo didžiausios vertinimo rezultatų variacijos nustatytos HER2 IHC 2+ kategorijoje. Kitaip nei kiti tyrimai [164, 165], kurie rodo, kad skaitmeninė analizė dėl didesnio šio testo specifiškumo leidžia atsisakyti dalies FISH tyrimų, mūsų duomenimis, atlikta skaitmeninė analizė pareikalavo daugiau FISH tyrimų. Tačiau atlikus skaitmeninę analizę daugiau naviko mėginių pateko ne tik į HER2 IHC 3+ kategoriją (sutaupyti FISH tyrimai), bet ir iš HER2 IHC 0/1+ navikų kategorijos keli mėginiai perkelti į HER2 IHC 2+ navikų kategoriją. Atlikus papildomus FISH tyrimus nustatyta HER2 geno amplifikacija. Todėl apibendrinant galima pasakyti, kad skaitmeninė analizė ne tik naudinga IHC žymenų raiškos vertinimo, bet ir svarbi IHC tyrimų kokybės kontrolės priemonė, kuri leidžia ne tik tiksliai, atkartojamai, bet ir kiekybiškai įvertinti IHC žymenų raišką naviko audiniuose.

Daugiamatė IHC vaizdų skaitmeninė analizė leido nustatyti svarbius biologinių žymenų ryšius navikiniame audinyje. Atlikę išsamų duktalinės krūties karcinomos mėginių tyrimą mažesnėje pacienčių grupėje (n=109) – išanalizavę dešimties IHC žymenų raišką – nustatėme reikšmingus biologinių žymenų tarpusavio ryšius ir heterogenišką jų pasiskirstymą krūties navikiniame audinyje. Nustatyti ryšiai atitinka ir papildo kitų tyrėjų sukauptą informaciją apie krūties vėžio biologinius tipus, padeda geriau suvokti ligos kilmę bei suteikia naujų duomenų ir įžvalgų apie krūties vėžio biologinius procesus.

IHC tyrimo skaitmeninės analizės rezultatus analizavome naudodami faktorinę ir klasterinę analizę. Faktorinė analizė kiekviename tirtame navike leido atskleisti vidinius netiesioginius imunofenotipą nulemiančius dėsningumus, kuriuos galima vadinti nepriklausomais biologiniais procesais, darančiais įtaką tolesnei ligos eigai. Klasterinė analizė – natūraliai klasifikuoja tiriamuosius mėginius daugiamatėje erdvėje. Atliekant mūsų tyrimą nustatyti imunofenotipo įvairovę nulemiantys veiksniai ne tik atitinka kitų tyrėjų radinius, bet ir suteikia papildomai naujos informacijos. Mūsų tyrimo metu nustatyti veiksniai, kurie nulemia imunofenotipo variacijas, suteikia naujos

informacijos apie navikinį audinį, tačiau taip pat yra neatsiejami nuo dabartinių žinių apie krūties vėžio biologinius procesus.

Savo tyrimais nustatėme, kad svarbiausias IHC žymenų profilio variacijų veiksnys krūties duktalinėje karcinomoje – stiprus atvirkštinis ryšys tarp hormonų receptorių (ER, PR, AR) raiškos ir antiapoptozinių žymenų: vienavertus – BCL2, kitavertus – Ki67 (proliferacijos žymuo) ir HIF1 $\alpha$  (atsaką į hipoksiją kontroliuojantis transkripcijos veiksnys). Nors atliekant porines duomenų koreliacijas buvo aptiktos atitinkamos koreliacijos, žymenų tarpusavio ryšiai buvo silpni ir dėl daugybinių tarpusavio sąveikų – sunkiai interpretuojami. Pirmąjį vidinį veiksnį, kuris paaiškina didžiąją dalį IHC duomenų variacijų, mes pavadiname – i-G kadangi šio veiksnio struktūra atitinka žinomas IHC žymenų išsidėstymo variacijas nuo naviko agresyvumą sąlygojančių (Ki67, HIF1 $\alpha$ ) iki mažesni agresyvumą sąlygojančių (HR, BCL2) [166]. Iš dalies biologinė i-G reikšmė apibūdinama anti-apoptozine $\longleftrightarrow$ proliferacine naviko elgsena. Svarbu tai, kad antiapoptozinis naviko poveikis yra glaudžiai susijęs su HR raiška, o naviko proliferacija – su padidėjusio hipoksinio streso ir angiogenezės rodikliu (HIF1 $\alpha$ ). Pirmojo veiksnio (i-G) biologinė prigimtis pasitvirtino nustačius bimodalinį šio veiksnio verčių pasiskirstymą, stiprią koreliaciją su geresniu naviko diferenciacijos laipsniu ir su agresyvesniais biologiniais naviko tipais (HER2+ ir TN). i-G veiksnys gali būti integruojamas į esamas krūties vėžio žymenų sistemas kaip žymuo, leidžiantis išskirti agresyvias duktalinės karcinomos subgrupes iš jau esamų grupių.

Pirmojo veiksnio (i-G) struktūra atskleidžia svarbias sąveikas tarp HR, BCL2, Ki67 ir HIF1 $\alpha$ . Mūsų duomenys patvirtina, kad BCL2 gali būti naudingas žymuo, papildantis navikų vertinimo schemas, apie ką neseniai paskelbė Dawson su bendraautorais [106]. Taip pat sudėtinis mitozijų/BCL2 ar Ki67/BCL2 indeksas atspindi tikrąją krūties vėžio biologinę variaciją ir gali suteikti reikšmingos prognozinės informacijos [152, 167]. Šie neseni publikuoti pastebėjimai pagrįsti pusiau kiekybinėmis dviejų biologinių žymenų raiškos vertinimo reikšmėmis; Ki67/BCL2 indeksas buvo apskaičiuotas iš Ki67

atėmus BCL2 raiškos vertinimo vertes. Mūsų duomenimis, pirmojo veiksnio (i-G) vertės labai stipriai koreliavo ( $r=0,89$ ,  $p<0,0001$ ) su Ki67 ir BCL2 baltymų raiškos skirtumu (procentas ląstelių, kuriose nustatyta Ki67 baltymo raiška, minus procentas ląstelių, kuriose nustatyta BCL2 baltymo raiška). Kitaip negu kiti autoriai [152], Ki67/BCL2 indeksui apskaičiuoti naudojome kiekybinius analizės duomenis ir daugiamatę statistiką. Papildomai mūsų duomenys parodė, kad įtrauktas į šią analizę HIF1 $\alpha$  žymuo suteikia naujos informacijos apie naviko vystymosi eigą.

Grupėje navikų, kuriuose nustatyta padidėjusi hormonų receptorių raiška – HR+ (LA, LB ir LB HER2+) – išskirtas trečiasis veiksnys (Ki67-ER), savo struktūra panašus į pirmąjį i-G veiksni. Trečiasis veiksnys, kaip ir pirmasis, statistiškai patikimai koreliuoja su naviko diferenciacijos laipsniu ir biologiniu tipu. Vertindami “agresyvumo indeksą” HR+ navikų grupėje, nustatėme, kad trečiasis veiksnys (Ki67-ER) nebebuvo pagrindinis variacijų šaltinis – veiksnio vertės nebuvo pasiskirsčiusios bimodališkai. Šis pokytis galėtų būti aiškinamas sumažėjusios Ki67 raiškos variacija tiriamojoje navikų grupėje, iš kurios pašalinti labiau proliferuojančių tipų navikai (TN ir HER2+). Antra vertus, trečiojo veiksnio struktūra leidžia manyti, kad naviko agresyvumą HR+ navikų grupėje tiksliau apibūdina Ki67/ER indeksas nei Ki67/BCL2 indeksas. Kitaip sakant, ER raiška yra glaudžiai susijusi su BCL2 žymens raiška, todėl kartu su Ki67 žymeniu tinkamai charakterizuoja HR+ navikus. Nors klinikinei praktikai BCL2, kaip prognoziniis žymuo, buvo pasiūlytas anksčiau [106, 168, 169], vertindami savo duomenis, matome, kad šio žymens įtaka navikui formuotis turėtų būti detaliau išanalizuota atlikus didesnės apimties tyrimus naudojant daugiamatę duomenų analizę. Trečia, nepaisant to, kad Ki67-ER veiksnys stipriai koreliuoja su naviko diferenciacijos laipsniu ir biologiniu tipu, dalis geros diferenciacijos (G1) navikų ir luminalinio A tipo grupės navikai pateko į Ki67-ER-G2 navikų kategoriją (atitinkamai, 16, 21% pacienčių mėginiai). Tai leidžia manyti, kad naudojamas sudėtinis žymenų indeksas suteikia papildomos informacijos, apsaugančios nuo klaidingo baltymų raiškos interpretavimo, ypač paribinės raiškos vertinimo atvejais. Yra paskelbta, kad

pagal Ki67 indeksą vidutinio diferenciacijos laipsnio (G2) navikus galima suskirstyti į dvi atskiras žemos ir aukštos rizikos grupes [170]. Taip pat manome, kad sudėtinio indekso naudojimas klinikinėje praktikoje leistų tiksliau išskirti luminalinio A ir luminalinio B tipo navikų grupes prieš priimant sprendimą dėl pacienčių gydymo.

HER2 baltymo raiška krūties duktalinės karcinomos mėginių grupėje buvo nepriklausoma nuo kitų IHC parametrų, tačiau HR+ mėginių grupėje HER2 raiška dažniausiai konkuravo ne su ER, o su PR. Šiuos intriguojančius radinius kol kas sunku interpretuoti, kadangi nėra pakankamai informacijos apie nepriklausomą ER ir PR (taip pat ir BCL2) žymenų reikšmę bei šių žymenų tarpusavio koreliacijas. PR raiškos nebuvimas rodo blogesnę prognozę, palyginti su prognoze navikų, kuriuose nustatyta padidėjusi ER/PR receptorių raiška, tuotarpu tirdami mėginius įvairiais BCL2, p53, HER2 žymenų deriniais gauname papildomos prognozinės informacijos, apie ką neseniai užsiminė Rakha su bendraautoriais [166]. Atlikdami savo tyrimą nustatėme porines koreliacijas tarp ER, PR ir BCL2, tačiau atlikta faktorinė analizė atskleidė tikruosius vidinius tarpusavio žymenų ryšius: krūties duktalinės karcinomos mėginiuose patvirtinome, kad HR ir BCL2 žymenys pasižymi stipriais tarpusavio ryšiais, valdomais tų pačių vidinių veiksnių ir kurtu būdingu priešingu – Ki67 ir HIF1 $\alpha$  žymenų raiškos ryšiu. Didelės ER raiškos navikai HR+ navikų grupėje rasti mažiau praliferuojančiuose (Ki67) navikuose, o maža PR raiška gali žymėti didesnę HER2 baltymo raišką. Todėl ER ir PR raiškos skirtumai gali atspindėti proliferacinio aktyvumo bei HER2 baltymo raiškos skirtumus HR+ navikų grupėje, lydimus susijusios prognozinės informacijos (jei didėjanti HER2 baltymo raiška vertintina kaip didėjantis naviko agresyvumo veiksnys). Kaip pažymėta anksčiau, mūsų tyrime iškelta prielaida, kad BCL2 raiška patikimai koreliuoja su HR raiška (visoje tirtoje ir HR+ navikų grupėse) pasitvirtino turimame nepriklausomų duomenų rinkinyje.

Mūsų tyrimas parodė galimą naujų žymenų reikšmę krūties vėžio diagnostikoje. SATB1 – genomo organizatorius, kuris reguliuoja fermentų

veiklą chromatino struktūros persitvarkymo ir genų raiškos pokyčių procesų metu. Yra nuomonių, kad šie pokyčiai krūties vėžio atvejais skatina metastazių atsiradimą ir rodo blogesnę prognozę [171, 172]. Kitų tyrėjų darbais tai nebuvo patvirtinta, todėl SATB1 žymens prognozinė reikšmė ir pritaikymas klinikinėje praktikoje išlieka kontroversiškas [103, 173-175]. Nėgana to, išanalizavus 2058 krūties vėžio mėginių SATB1 žymens mRNA raišką, šios raiškos sąsajos su pacienčių išgyvenimu iki prasidedant ligos atkryčiui ER- navikų grupėje nenustatytos, kita vertus, didelė SATB1 raiška ER+ navikų grupėje buvo susijusi su geresne ligos prognoze; vis dėlto net ir ER+ navikų grupėje naudojant standartinius analizės daugiavariacinius parametrus nebuvo nenustatyta nepriklausoma šio žymens prognozinė vertė [174]. Patani ir bendraautorių atliktame tyrime nustatyta, kad didesnė SATB1 raiška dažniau randama ER- navikų grupėje [172]. Mūsų tyrimas pirmą kartą parodo akivaizdžią SATB1 baltymo raiškos, nustatytos IHC metodu, koreliaciją su ER ir kitais žymenimis. Atliktame darbe išskirto pirmojo veiksnio (SATB1/HIF-1 $\alpha$ -AR/ER/BCL2) struktūra HR+ navikų grupėje atskleidė priešingus ryšius tarp dviejų skirtingų žymenų grupių. Iš tiesų tikėtina, kad prognozinis SATB1 žymens poveikis gali būti apibūdinamas priešingu ER raiškos ryšiu [174]. Nėgana to, mes neradome jokių asociacijų tarp SATB1 raiškos ir naviko diferenciacijos laipsnio ar kitų tirtų naviką apibūdinančių charakteristikų. Nepaisant to, įdomu, kad SATB1 raiška yra glaudžiai susijusi su HIF1 $\alpha$  tiek HR+, tiek visoje krūties duktalinės karcinomos navikų grupėje; veiksniai, kuriuose dalyvauja SATB1 ir HIF1 $\alpha$  žymenys, nulemia didžiąją dalį variacijų abiejose tiriamosiose grupėse, ypač HR+ navikų grupėje.

HIF1 $\alpha$  baltymo raiška yra nustatoma daugelyje žmogaus vėžio rūšių ir koreliuoja su blogesne prognoze. Šis baltymas daro įtaką daugeliui procesų – naviko iniciacijai, progresijai, invazijai, uždegiminių ląstelių telkimuisi, metastazavimui ir gali būti krūties vėžio gydymo taikiniu [176]. Yamamoto su bendraautoriais [177], išanalizavę 171 invazinės krūties karcinomos mėginį, 37 procentuose atvejų rado HIF1 $\alpha$  baltymo raišką (šiam, kaip ir ankstesniame tyrime buvo naudota 5 procentų teigiamos raiškos ribinė vertė [178]). HIF1 $\alpha$

baltymo raiška labai susijusi su agresyvesniu naviko fenotipu, taip kaip su aukštesniu naviko diferenciacijos laipsniu, metastazėmis limfmazgiuose, dideliu naviko dydžiu, dideliu proliferacijos laipsniu, neigiama hormonų receptorių raiška, padidėjusia HER2 ir VEGF baltymo raiška; padidėjusi HIF1 $\alpha$  baltymo raiška koreliuoja su trumpesniu pacienčių išgyvenimu nesant recidyvo ir bendruoju jų išgyvenimu [177]. Sąsajos tarp HIF1 $\alpha$  baltymo raiškos ir nepalankios ligos prognozės esant krūties vėžiui, atskleistos ir kituose darbuose [178-180]. Savo darbe naudodami kelis tyrimo metodus patvirtinome sąsajas tarp HIF1 $\alpha$  ir Ki67 baltymo raiškos krūties duktalinėje karcinomoje: porinės koreliacijos ir pirmojo veiksnio (i-G) struktūra. Taip pat i-G veiksnio vertės stipriai koreliavo su naviko diferenciacijos laipsniu, patvirtinančiu agresyvesnę HIF $\alpha$  ir Ki67 baltymų prigimtį (patvirtinta vienfaktorine ANOVA naudojant HIF1 $\alpha$  ir Ki67 kaip priklausomus kintamuosius). Visgi mūsų atlikta faktorinė analizė atskleidžia kai kuriuos ypatumus. Pirma, krūties duktalinės karcinomos grupėje nustatėme, kad HIF1 $\alpha$  baltymo raiška padidėjusi dviejuose veiksmuose: pirmajame veiksmoje (i-G) kartu su Ki67 žymeniu ir antrajame veiksmoje – kartu su SATB1. Antra, HR+ duktalinės karcinomos navikų grupėje HIF1 $\alpha$  padidėjusi raiška nustatyta reikšmingiausiame pirmajame veiksmoje kartu su SATB1 suteikdama krūčius, priešingus AR, ER ir BCL2, nepriklausomai nuo Ki67 raiškos (trečiojo veiksnio). Tai leidžia daryti prielaidą, kad HIF1 $\alpha$  ir SATB1 gali atspindėti svarbią biologinę informaciją, kitokią nei ligos agresyvumas, atspindimas Ki67 baltymo raiškos ir naviko diferenciacijos laipsnio, bent jau HR+ navikų grupėje.

p16 baltymo raiška mūsų analizėje buvo valdoma nepriklausomo veiksnio ir išsiskyrė didele raiška TN tipo navikuose, palyginti su kitų biologinių tipų navikais. Taigi mes patvirtiname skelbtus duomenis [181-184], kad padidėjusi p16 baltymo raiška TN navikų grupėje taip pat galbūt susijusi su retinoblastomos naviko supresoriumi (Rb) ir nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitoriumi. Nėgana to, p16 baltymo raiškos slopinimas nustatytas kai kuriuose TN krūties vėžio ląstelių linijose, manoma, kad šias ląsteles galima padalyti į dvi grupes pagal Rb ir p16 statusą [185]. Įdomu tai, kad

atlikta faktorinė analizė 17 TN navikų grupėje atskleidė stiprų p16 ryšį su Ki67 ir stiprų atvirkštinį ryšį su AR (tačiau ne su ER ir PR) raiška. Šiuos duomenis reiktų patvirtinti ištyrus didesnę navikinių mėginių grupę.

Klasterinė duktalinės karcinomos analizė penkių variacijos veiksnių, nustatytų IHC žymenų faktorinės analizės būdu erdvėje, leido išskirti tris pagrindines viena nuo kitos nutolusias navikų grupes, gerai atitinkančias biologinius subtipus: luminalinį (A ir B), HER2+ ir TN. Šie rezultatai iš esmės atitinka anksčiau publikuotus duomenis apie klasterinės analizės galimybes žymenų IHC analize nustatyti heterogeniškas krūties vėžio grupes. Kitaip nei cituojamame darbe, kuriame buvo naudojami pusiau kiekybiniai parametrai, mes naudojome kiekybinius duomenis. Kadangi mūsų tirta pacienčių grupė buvo santykinai nedidelė ir didžioji atvejų dalis pateko į luminalinį A ir B klasterį, manome, kad tolesniam šios navikų grupės heterogeniškumo tyrimui reikalinga didesnė pacienčių grupė ir/arba parametrų rinkinys.

## 6. IŠVADOS

1. Skaitmeninė vaizdo analizė yra patikimas būdas žymenų raiškos, analizuotos imunohistocheminiu tyrimo metodu, įvertinimui krūties vėžio audinyje. Ki67 raiškos skaitmeninės vaizdo analizės rezultatai stipriai koreliavo ( $r=0,86$ ) su patologo vertinimu ir turėjo mažesnę sisteminių nuokrypį nuo stereologiškai nustatytų referentinių verčių. HER2 raiškos skaitmeninės vaizdo analizės rezultatai atitiko patologo vertinimą ( $\kappa=0,86$ ) ir leido tiksliau nustatyti amplifikuotus (HER2 FISH) krūties vėžio atvejus.

2. Biologinių žymenų – ER, PR, HER2, Ki67 – imunohistocheminio tyrimo analize pagrįstas krūties duktalinių karcinomų skirstymas į biologinius tipus padeda atskleisti krūties vėžio biologinę įvairovę:

2.1. duktalinių krūties karcinomų grupėje ( $n=203$ ) nustatytos statistiškai patikimos sąsajos tarp biologinio naviko tipo ir ligos stadijos ( $p<0,00002$ ),

naviko diferenciacijos laipsnio ( $p < 0,0001$ ), metastazių sritiniuose limfmazgiuose ( $p < 0,0002$ );

2.2. genų *ESR1-4* ir *p16* hipermetilinimas bei geno *TP53* mutacijos susijęs ( $p < 0,05$ ) su biologiniu krūties vėžio tipu;

2.3. biologiniams krūties vėžio tipams būdingas savitas baltymų ER, PR, AR, HER2, Ki67, BCL2, HIF1 $\alpha$ , SATB1, p53, p16 raiškos intensyvumo profilis: visų, išskyrus p53, imunohistocheminių žymenų raiškos intensyvumas buvo susijęs ( $p < 0,05$ ) su biologiniu krūties vėžio tipu.

3. Skaitmeninės vaizdo analizės būdu įvertinto imunohistocheminio žymenų rinkinio daugiamatė analizė yra efektyvus tyrimo metodas, leidžiantis atskleisti baltymų raiškos profilių dėsningumus:

3.1. duktalinių krūties karcinomų grupėje ( $n=109$ ) faktorinės daugiamatės analizės būdu identifikuotas ligos agresyvumą atitinkantis veiksnys (i-G) pasireiškia priešingos krypties ER/PR/AR/BCL2 ir Ki67/HIF1 $\alpha$  raiška. Šio veiksnio vertės stipriai susijusios su naviko diferenciacijos laipsniu ir agresyviais biologiniais tipais;

3.2. SATB1 kartu su HIF1 $\alpha$  formuoja antrą reikšmingą variacijos veiksnį krūties duktalinės karcinomos grupėje. Šie žymenys gali suteikti svarbios biologinės informacijos apie krūties vėžio navikus nepriklausomai nuo Ki67 raiškos ir naviko diferenciacijos laipsnio;

3.3. hormonų receptoriams teigiamų navikų grupėje ( $n=85$ ) naviko agresyvumą geriausiai atspindi Ki67 ir ER žymenų derinys. Šis indeksas gali suteikti papildomos prognostinės informacijos greta jau naudojamų prognostinių grupių;

3.4. hormonų receptoriams teigiamų navikų grupėje nustatytas atvirkštinis ryšys tarp HER2 ir PR raiškos bei tarp Ki67 ir ER raiškos atskleidžia ER ir PR disocijuotos raiškos biologinę reikšmę.



## **7. REKOMENDACIJOS**

1. Mūsų darbo rezultatai rodo, kad biologinių žymenų nustatymas audinių mikrogardelėse, panaudojant skaitmeninės vaizdo analizės technologijas, leidžia padidinti šių tyrimų tikslumą ir efektyvumą. Siūlome skaitmeninio vaizdo IHC analizę naudoti kokybei užtikrinti bei sprendimams palaikyti klinikinėje praktikoje, šias priemones validuojant ne tik pagal patologo vertinimo rezultatus, bet ir stereologiniais tyrimo metodais.
2. Siūlome įdiegti į klinikinę praktiką integruotus IHC žymenų rinkinius (kompleksinius žymenis), kurie atskleidžia vidinius biologinių žymenų tarpusavio sąsajų dėsninumus ir atveria naujas galimybes prognozuoti krūties duktalinės karcinomos ligos eigą.

## 8. PUBLIKACIJOS IR DISERTACIJOS TEMA SKAITYTI PRANEŠIMAI

### DISERTACIJOS TEMA

ISI sąrašo žurnalai

1. Laurinavicius A., **Laurinaviciene A**, Ostapenko V, Dasevicius D, Jarmalaite S, Lazutka J. Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data. *Diagn Pathol* 2012, priimta spaudai.
2. Laurinavicius A, **Laurinaviciene A**, Dasevicius D, Elie N, Plancoulaine B, Bor C, Herlin P. Digital image analysis in pathology: Benefits and obligations. *Anal Cell Pathol* 34 (2011) 1–4.
3. **Laurinaviciene A**, Dasevicius D, Ostapenko V, Jarmalaite S, Lazutka J, Laurinavicius A. Membrane connectivity estimated by digital image analysis of HER2 immunohistochemistry is concordant with visual scoring and fluorescence in situ hybridization results: algorithm evaluation on breast cancer tissue microarrays. *Diagn Pathol* 2011, 6(1):87.

### KITOS PUBLIKACIJOS

ISI sąrašo žurnalai

1. Jarmalaite S., **A. Laurinaviciene**, J. Tverkuviene, N. Kalinauskaite, D. Petroska, T. Bohling, K. Husgafvel-Pursiainen: Tumor suppressor gene ZAC/PLAGL1: altered expression and loss of the nonimprinted allele in pheochromocytomas. *Cancer Genetics* 2011, 204(7):398-404.

Kiti referuojami leidiniai

1. J. Tverkuviene, **A. Laurinaviciene**, K. Daniunaitė, A. Scesnaite, S. Jarmalaite: Frequent aberrant DNA methylation of CDKN2A locus in capillary hemangioblastomas, pheochromocytomas and gliomas. *Acta Medica Lithuanica*, 2011. Vol. 18. No. 1. P. 4–11.

2. **A. Laurinavičienė**, D. Petroska, J. Tverkuviene, K. Daniunaite, A. Scesnaite, S. Jarmalaite: Frequent aberrant expression of p53 protein in gliomas, but not in capillary hemangioblastomas and pheochromocytomas. *Acta Medica Lithuanica*, 2009 Vol. 16. No. 3–4. P. 130–138.
3. Česas A., Stratilatovas E., **Laurinavičienė A.** Biožymenų svarba gydant kolorektalinį vėžį biologine terapija cetuksimabu. *Onkologija: žurnalo Internistas priedas*. 2009; 4:58-59.
4. V.Žalgevičienė, **A.Laurinavičienė**. Bendrosios histologijos pradmenys. Mokomoji priemonė. Vilnius: Vaistų žinios, 2009.
5. **A.Laurinavičienė**, R.Smaliukienė. Histologinių technologijų vadovas. Mokomoji priemonė. Vilnius, Eugrimas, 2007.

#### SKAITYTI PRANEŠIMAI

1. Doktorantų stažuotės, projektas „Studentų mokslinės veiklos skatinimas“: Ankstyvo krūties vėžio heterogeniškumo tyrimai audiniuose, 2011-03-17.
2. Molecular pathology for diagnosis and treatment: The use of tissue microarrays for breast cancer research – experience at the National Center of Pathology, 2010-02-26.
3. Pathology diagnosis and treatment of Early breast cancer: Molecular characterization of early breast cancer: preliminary results of ongoing collaborative research project, 2009-11-27.
4. Tirozinkinazės receptoriaus *ErbB-2 (HER2)* teigiamo krūties vėžio gydymo aktualijos: *ErbB* receptorių ir intraląstelinio signalo perdavimo biologija, 2009-02-06.
5. Tiksli krūties vėžio diagnozė iki gydymo pradžios: prognostiniai ir predikciniai veiksniai: Molekulinių žymenų nustatymas krūties vėžio audinyje, 2009-04-08.

## KONFERENCIJŲ MEDŽIAGA (TEZĒS)

1. S. Jarmalaite, **A. Laurinavičienė**, J. Dimonaite, A. Scesnaite, D. Dasevicius, V. Ostapenko, J. Lazutka: Epigenetic and genetic biomarkers, of early-stage breast cancer. *Cellular Oncology*, 30 (3): 259-260, 2008.
2. Dimonaite, **A. Laurinavičienė**, D. Petroska, N. Kalinauskaite, A. Scesnaite, S. Jarmalaite: Epigenetic changes in pathogenesis of VHL-related tumours and primary gliomas. *Cellular Oncology*, 30 (3): 254-255, 2008.

## 9. CITUOJAMŲ LITERATŪROS ŠALTINIŲ SĄRAŠAS

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA *et al*: **Molecular portraits of human breast tumours**. *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.
2. Prat A, Perou CM: **Deconstructing the molecular portraits of breast cancer**. *Mol Oncol* 2011, **5**(1):5-23.
3. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z *et al*: **Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes**. *J Clin Oncol* 2009, **27**(8):1160-1167.
4. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L *et al*: **Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma**. *Clin Cancer Res* 2004, **10**(16):5367-5374.
5. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C *et al*: **Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies**. *PLoS Med* 2010, **7**(5):e1000279.
6. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M *et al*: **Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial**. *J Clin Oncol* 2009, **27**(8):1168-1176.
7. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS *et al*: **Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer**. *J Natl Cancer Inst* 2009, **101**(10):736-750.
8. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, Smith LV, Labbok MH, Geradts J, Bensen JT *et al*: **Epidemiology of basal-like breast cancer**. *Breast Cancer Res Treat* 2008, **109**(1):123-139.
9. Phipps AI, Chlebowski RT, Prentice R, McTiernan A, Stefanick ML, Wactawski-Wende J, Kuller LH, Adams-Campbell LL, Lane D, Vitolins M *et al*: **Body size, physical activity, and risk of triple-negative and estrogen receptor-positive breast cancer**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011, **20**(3):454-463.
10. Phipps AI, Buist DS, Malone KE, Barlow WE, Porter PL, Kerlikowske K, Li CI: **Reproductive history and risk of three breast cancer subtypes defined by three biomarkers**. *Cancer Causes Control* 2011, **22**(3):399-405.
11. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M *et al*: **Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer**. *J Clin Oncol* 2008, **26**(8):1275-1281.
12. Dignam JJ, Dukic V, Anderson SJ, Mamounas EP, Wickerham DL, Wolmark N: **Hazard of recurrence and adjuvant treatment effects over time in lymph node-negative breast cancer**. *Breast Cancer Res Treat* 2009, **116**(3):595-602.
13. Aebi S, Sun Z, Braun D, Price KN, Castiglione-Gertsch M, Rabaglio M, Gelber RD, Crivellari D, Lindtner J, Snyder R *et al*: **Differential efficacy of three cycles of CMF followed by tamoxifen in patients with ER-positive and ER-negative tumors: Long-term follow up on IBCSG Trial IX**. *Ann Oncol* 2011.
14. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, Ravdin P, Bugarini R, Baehner FL, Davidson NE *et al*: **Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive,**

- oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial.** *Lancet Oncol* 2010, **11**(1):55-65.
15. Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A, Abi Raad RF, Boon WL, Bellon JR, Wong JS, Smith BL, Harris JR: **Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(14):2373-2378.
  16. Tang G, Shak S, Paik S, Anderson SJ, Costantino JP, Geyer CE, Jr., Mamounas EP, Wickerham DL, Wolmark N: **Comparison of the prognostic and predictive utilities of the 21-gene Recurrence Score assay and Adjuvant! for women with node-negative, ER-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **127**(1):133-142.
  17. Wo JY, Taghian AG, Nguyen PL, Raad RA, Sreedhara M, Bellon JR, Wong JS, Gadd MA, Smith BL, Harris JR: **The association between biological subtype and isolated regional nodal failure after breast-conserving therapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010, **77**(1):188-196.
  18. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ: **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** *Ann Oncol* 2011, **22**(8):1736-1747.
  19. Basavanhally AN, Ganesan S, Agner S, Monaco JP, Feldman MD, Tomaszewski JE, Bhanot G, Madabhushi A: **Computerized image-based detection and grading of lymphocytic infiltration in HER2+ breast cancer histopathology.** *IEEE transactions on bio-medical engineering* 2010, **57**(3):642-653.
  20. Ali S, Veltri R, Epstein JI, Christudass C, Madabhushi A: **Adaptive energy selective active contour with shape priors for nuclear segmentation and gleason grading of prostate cancer.** *Med Image Comput Comput Assist Interv* 2011, **14**(Pt 1):661-669.
  21. Hipp J, Flotte T, Monaco J, Cheng J, Madabhushi A, Yagi Y, Rodriguez-Canales J, Emmert-Buck M, Dugan MC, Hewitt S *et al*: **Computer aided diagnostic tools aim to empower rather than replace pathologists: Lessons learned from computational chess.** *J Pathol Inform* 2011, **2**:25.
  22. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ: **Cancer statistics, 2009.** *CA Cancer J Clin* 2009, **59**(4):225-249.
  23. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS *et al*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(19):10869-10874.
  24. Reis-Filho JS, Simpson PT, Gale T, Lakhani SR: **The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization.** *Pathol Res Pract* 2005, **201**(11):713-725.
  25. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR *et al*: **Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**(4):207.
  26. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR: **Molecular evolution of breast cancer.** *J Pathol* 2005, **205**(2):248-254.
  27. Kayser K: **Quantification of virtual slides: Approaches to analysis of content-based image information.** *J Pathol Inform* 2011, **2**:2.
  28. Mulrane L, Rexhepaj E, Penney S, Callanan JJ, Gallagher WM: **Automated image analysis in histopathology: a valuable tool in medical diagnostics.** *ExpertRevMolDiagn* 2008, **8**(6):707-725.

29. Soenksen D: **Digital pathology at the crossroads of major health care trends: corporate innovation as an engine for change.** *ArchPatholLab Med* 2009, **133**(4):555-559.
30. Cregger M, Berger AJ, Rimm DL: **Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression.** *Archives of pathology & laboratory medicine* 2006, **130**(7):1026-1030.
31. Joshi AS, Sharangpani GM, Porter K, Keyhani S, Morrison C, Basu AS, Gholap GA, Gholap AS, Barsky SH: **Semi-automated imaging system to quantitate Her-2/neu membrane receptor immunoreactivity in human breast cancer.** *Cytometry A* 2007, **71**(5):273-285.
32. Hall BH, Ianosi-Irimie M, Javidian P, Chen W, Ganesan S, Foran DJ: **Computer-assisted assessment of the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 immunohistochemical assay in imaged histologic sections using a membrane isolation algorithm and quantitative analysis of positive controls.** *BMC Medical Imaging* 2008, **8**(1):11.
33. Gustavson MD, Bourke-Martin B, Reilly D, Cregger M, Williams C, Mayotte J, Zerkowski M, Tedeschi G, Pinard R, Christiansen J: **Standardization of HER2 immunohistochemistry in breast cancer by automated quantitative analysis.** *Arch Pathol Lab Med* 2009, **133**(9):1413-1419.
34. Tadrous PJ: **On the concept of objectivity in digital image analysis in pathology.** *Pathology* 2010, **42**(3):207-211.
35. Lloyd MC, Allam-Nandyala P, Purohit CN, Burke N, Coppola D, Bui MM: **Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it?** *J Pathol Inform* 2010, **1**:29.
36. Słodkowska J, Filas V, Buszkiewicz E, Trzeciak P, Wojciechowski M, Koktysz R, Staniszewski W, Breborowicz J, Rojo MG: **Study on breast carcinoma Her2/neu and hormonal receptors status assessed by automated images analysis systems: ACIS III (Dako) and ScanScope (Aperio).** *Folia Histochem Cytobiol* 2010, **48**(1):19-25.
37. Gavrielides MA, Gallas BD, Lenz P, Badano A, Hewitt SM: **Observer variability in the interpretation of HER2/neu immunohistochemical expression with unaided and computer-aided digital microscopy.** *Arch Pathol Lab Med* 2011, **135**(2):233-242.
38. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *Int J Cancer* 2010, **127**(12):2893-2917.
39. Lietuvos vėžio registras. <http://www.vuoi.lt>.
40. Botha JL, Bray F, Sankila R, Parkin DM: **Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries.** *Eur J Cancer* 2003, **39**(12):1718-1729.
41. Sant M, Francisci S, Capocaccia R, Verdecchia A, Allemani C, Berrino F: **Time trends of breast cancer survival in Europe in relation to incidence and mortality.** *Int J Cancer* 2006, **119**(10):2417-2422.
42. Bilimoria MM, Morrow M: **The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies.** *CA Cancer J Clin* 1995, **45**(5):263-278.
43. Bird A: **DNA methylation patterns and epigenetic memory.** *Genes & development* 2002, **16**(1):6-21.
44. Esteller M: **Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation.** *Hum Mol Genet* 2007, **16 Spec No 1**:R50-59.
45. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M: **DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease.** *Journal of cellular physiology* 2005, **204**(1):21-35.
46. Das PM, Singal R: **DNA methylation and cancer.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(22):4632-4642.

47. Chuang JC, Jones PA: **Epigenetics and microRNAs**. *Pediatr Res* 2007, **61**(5 Pt 2):24R-29R.
48. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG: **A gene hypermethylation profile of human cancer**. *Cancer Res* 2001, **61**(8):3225-3229.
49. Esteller M: **Relevance of DNA methylation in the management of cancer**. *Lancet Oncol* 2003, **4**(6):351-358.
50. Szyf M: **Targeting DNA methylation in cancer**. *Ageing research reviews* 2003, **2**(3):299-328.
51. Robertson KD: **DNA methylation, methyltransferases, and cancer**. *Oncogene* 2001, **20**(24):3139-3155.
52. Urruticoechea A, Dowsett M, Mackay A, Dexter T, Young O, Miller WR, Evans DB, Dixon GM: **Molecular characterisation of ER plus breast cancer before and during treatment with the aromatase inhibitors, letrozole and anastrozole**. *Journal of Clinical Oncology* 2005, **23**(16):850s-850s.
53. Jimenez Ruiz CA, Barrueco Ferrero M, Solano Reina S, Torrecilla Garcia M, Dominguez Grandal F, Diaz-Maroto Munoz JL, Alonso Moreno J, La Cruz Amoros Ed E, Abengozar Muela R: **[Guidelines for a diagnostic and therapeutic approach to smoking addiction. A consensus report]**. *Archivos de bronconeumologia* 2003, **39**(1):35-41.
54. Kendall A, Anderson H, Dunbier AK, Mackay A, Dexter T, Urruticoechea A, Harper-Wynne C, Dowsett M: **Impact of estrogen deprivation on gene expression profiles of normal postmenopausal breast tissue in vivo**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, **17**(4):855-863.
55. Song MS, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, Lee JH, Hong HK, Lee H, Choi N, Kim J, Kim H *et al*: **The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex**. *Nature cell biology* 2004, **6**(2):129-137.
56. Bird AW, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu Q, Harmon KE, Megee PC, Grant PA, Smith MM, Christman MF: **Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair**. *Nature* 2002, **419**(6905):411-415.
57. Bird A: **The essentials of DNA methylation**. *Cell* 1992, **70**(1):5-8.
58. Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S *et al*: **Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia**. *Oncogene* 2001, **20**(3):329-335.
59. Esteva FJ, Hortobagyi GN: **Prognostic molecular markers in early breast cancer**. *Breast Cancer Res* 2004, **6**(3):109-118.
60. Thomson CS, Twelves CJ, Mallon EA, Leake RE: **Adjuvant ovarian ablation vs CMF chemotherapy in premenopausal breast cancer patients: trial update and impact of immunohistochemical assessment of ER status**. *Breast* 2002, **11**(5):419-429.
61. Harris LN, Hayes DF, Bast RC: **Inconsistent criteria used in American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer - Reply**. *Journal of Clinical Oncology* 2008, **26**(12):2060-2061.
62. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, Pearson OH, Marshall JS: **Progesterone receptors as a prognostic factor in Stage II breast cancer**. *The New England journal of medicine* 1983, **309**(22):1343-1347.
63. Thakkar JP, Mehta DG: **A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative**. *Oncologist* 2011, **16**(3):276-285.
64. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, To TV, Qian Z, Love RR, Allred DC: **Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study**. *Mod Pathol* 2004, **17**(12):1545-1554.



65. Yamashita H, Yando Y, Nishio M, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H: **Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer.** *Breast Cancer* 2006, **13**(1):74-83.
66. Ogawa Y, Moriya T, Kato Y, Oguma M, Ikeda K, Takashima T, Nakata B, Ishikawa T, Hirakawa K: **Immunohistochemical assessment for estrogen receptor and progesterone receptor status in breast cancer: analysis for a cut-off point as the predictor for endocrine therapy.** *Breast Cancer* 2004, **11**(3):267-275.
67. Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, Rayter S, Tutt AN, Ashworth A: **A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor.** *The EMBO journal* 2008, **27**(9):1368-1377.
68. Iorns E, Lord CJ, Turner N, Ashworth A: **Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery.** *Nature reviews Drug discovery* 2007, **6**(7):556-568.
69. Xiao G, Madabhushi A: **Aggregated distance metric learning (ADM) for image classification in presence of limited training data.** *Med Image Comput Comput Assist Interv* 2011, **14**(Pt 3):33-40.
70. Hipp J, Smith SC, Cheng J, Tomlins SA, Monaco J, Madabhushi A, Kunju LP, Balis UJ: **Optimization of complex cancer morphology detection using the SIVQ pattern recognition algorithm.** *Anal Cell Pathol (Amst)* 2011.
71. Tiwari P, Viswanath S, Kurhanewicz J, Sridhar A, Madabhushi A: **Multimodal wavelet embedding representation for data combination (MaWERiC): integrating magnetic resonance imaging and spectroscopy for prostate cancer detection.** *NMR Biomed* 2011.
72. Park S, Koo J, Park HS, Kim JH, Choi SY, Lee JH, Park BW, Lee KS: **Expression of androgen receptors in primary breast cancer.** *Ann Oncol* 2010, **21**(3):488-492.
73. Tsezou A, Tzetis M, Gennatas C, Giannatou E, Pampanos A, Malamis G, Kanavakis E, Kitsiou S: **Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta (ESR1, ESR2) and androgen receptor (AR) genes with the occurrence of breast cancer.** *Breast* 2008, **17**(2):159-166.
74. Agrawal AK, Jelen M, Grzebieniak Z, Zukrowski P, Rudnicki J, Nienartowicz E: **Androgen receptors as a prognostic and predictive factor in breast cancer.** *Folia Histochem Cytobiol* 2008, **46**(3):269-276.
75. Nicolas Diaz-Chico B, German Rodriguez F, Gonzalez A, Ramirez R, Bilbao C, Cabrera de Leon A, Aguirre Jaime A, Chirino R, Navarro D, Diaz-Chico JC: **Androgens and androgen receptors in breast cancer.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, **105**(1-5):1-15.
76. Moe RE, Anderson BO: **Androgens and androgen receptors: a clinically neglected sector in breast cancer biology.** *J Surg Oncol* 2007, **95**(6):437-439.
77. Moinfar F, Okcu M, Tsybrovskyy O, Regitnig P, Lax SF, Weybora W, Ratschek M, Tavassoli FA, Denk H: **Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies.** *Cancer* 2003, **98**(4):703-711.
78. Bayer-Garner IB, Smoller B: **Androgen receptors: a marker to increase sensitivity for identifying breast cancer in skin metastasis of unknown primary site.** *Mod Pathol* 2000, **13**(2):119-122.
79. Selim AG, Wells CA: **Immunohistochemical localisation of androgen receptor in apocrine metaplasia and apocrine adenosis of the breast: relation to oestrogen and progesterone receptors.** *J Clin Pathol* 1999, **52**(11):838-841.
80. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC: **Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(15):e458.

81. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S: **American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.** *J Oncol Pract* 2010, **6**(4):195-197.
82. Patrono C, Scarano V, Cricchi F, Melone MA, Chiriaco M, Napolitano A, Malandrini A, De Michele G, Petrozzi L, Giraldi C *et al*: **Autosomal dominant hereditary spastic paraplegia: DHPLC-based mutation analysis of SPG4 reveals eleven novel mutations.** *Hum Mutat* 2005, **25**(5):506.
83. Sagnelli E, Pasquale G, Coppola N, Marrocco C, Scarano F, Imperato M, Sagnelli C, Scolastico C, Piccinino F: **Liver histology in patients with HBsAg negative anti-HBc and anti-HCV positive chronic hepatitis.** *J Med Virol* 2005, **75**(2):222-226.
84. Thami GP, Garg G, Singal A: **Surgical pearl: gauzabrasion--abrading superficial slough with rough dressing gauze.** *J Am Acad Dermatol* 2004, **51**(6):977-978.
85. Khanna S, Vij JC, Kumar A, Singal D, Tandon R: **Dengue fever is a differential diagnosis in patients with fever and abdominal pain in an endemic area.** *Ann Trop Med Parasitol* 2004, **98**(7):757-760.
86. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A *et al*: **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.** *Arch Pathol Lab Med* 2007, **131**(1):18-43.
87. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science* 1987, **235**(4785):177-182.
88. Kim Y, Zhou P, Qian L, Chuang JZ, Lee J, Li C, Iadecola C, Nathan C, Ding A: **MyD88-5 links mitochondria, microtubules, and JNK3 in neurons and regulates neuronal survival.** *J Exp Med* 2007, **204**(9):2063-2074.
89. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM: **HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues.** *Clin Breast Cancer* 2004, **5**(1):63-69.
90. Martinez R, Schackert G, Esteller M: **Hypermethylation of the proapoptotic gene TMS1/ASC: prognostic importance in glioblastoma multiforme.** *Journal of neuro-oncology* 2007, **82**(2):133-139.
91. Malheiros JA, Camargos ST, Oliveira JT, Cardoso FE: **A Brazilian family with Brown-Vialetto-van Laere syndrome with autosomal recessive inheritance.** *Arquivos de neuro-psiquiatria* 2007, **65**(1):32-35.
92. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC, Jr.: **American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(33):5287-5312.
93. Li J, Machius M, Chuang JL, Wynn RM, Chuang DT: **The two active sites in human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase operate independently without an obligatory alternating-site mechanism.** *J Biol Chem* 2007, **282**(16):11904-11913.
94. Matarazzo MR, De Bonis ML, Strazzullo M, Cerase A, Ferraro M, Vastarelli P, Ballestar E, Esteller M, Kudo S, D'Esposito M: **Multiple binding of methyl-CpG and polycomb proteins in long-term gene silencing events.** *Journal of cellular physiology* 2007, **210**(3):711-719.
95. Pernas S, Gil M, Benitez A, Bajen MT, Climent F, Pla MJ, Benito E, Guma A, Gutierrez C, Pisa A *et al*: **Avoiding Axillary Treatment in Sentinel Lymph Node Micrometastases of Breast Cancer: A Prospective Analysis of Axillary or Distant Recurrence.** *Ann Surg Oncol* 2009.

96. Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z: **Tissue microarray technology in breast cancer HER2 diagnostics.** *Pathol Res Pract* 2007, **203**(3):169-177.
97. Walker RA, Bartlett JM, Dowsett M, Ellis IO, Hanby AM, Jasani B, Miller K, Pinder SE: **HER2 testing in the UK: further update to recommendations.** *J Clin Pathol* 2008, **61**(7):818-824.
98. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ: **Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now?** *Ann Oncol* 2005, **16**(11):1723-1739.
99. Dowsett M, Urruticoechea A, Smith IE: **Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2005, **23**(28):7212-7220.
100. Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Dasevicius D, Elie N, Plancoulaine B, Bor C, Herlin P: **Digital image analysis in pathology: Benefits and obligation.** *Anal Cell Pathol (Amst)* 2011.
101. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M: **Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(28):7212-7220.
102. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M: **Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients.** *Br J Cancer* 2007, **96**(10):1504-1513.
103. Iorns E, Hnatyszyn HJ, Seo P, Clarke J, Ward T, Lippman M: **The role of SATB1 in breast cancer pathogenesis.** *J Natl Cancer Inst* 2010, **102**(16):1284-1296.
104. Bilalovic N, Vranic S, Hasanagic S, Basic H, Tatarevic A, Beslija S, Selak I: **The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to ER and PR in breast cancer.** *Bosnian journal of basic medical sciences / Udruzenje basicnih medicinskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences* 2004, **4**(4):5-12.
105. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U: **The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients.** *J Natl Cancer Inst* 1994, **86**(7):499-504.
106. Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA *et al*: **BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received.** *Br J Cancer* 2010, **103**(5):668-675.
107. Jung SY, Jeong J, Shin SH, Kwon Y, Kim EA, Ko KL, Shin KH, Ro J, Lee KS, Park IH *et al*: **Accumulation of p53 determined by immunohistochemistry as a prognostic marker in node negative breast cancer; analysis according to st gallen consensus and intrinsic subtypes.** *J SurgOncol* 2010.
108. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G: **p53 and breast cancer, an update.** *Endocr Relat Cancer* 2006, **13**(2):293-325.
109. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L: **Prognostic factors in early breast carcinoma.** *Cancer* 1994, **74**(1 Suppl):381-400.
110. Thor AD, Moore DH, II, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH *et al*: **Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers.** *J Natl Cancer Inst* 1992, **84**(11):845-855.
111. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC, Osborne CK, McGuire WL: **Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 1993, **85**(3):200-206.

112. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP: **Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients.** *J Natl Cancer Inst* 1992, **84**(14):1109-1114.
113. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bieche I *et al*: **The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(4):1157-1167.
114. Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H, Grenier J, Culine S, Theillet C: **Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations.** *Cancer Res* 2000, **60**(4):1077-1083.
115. Pharoah PD, Day NE, Caldas C: **Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis.** *Br J Cancer* 1999, **80**(12):1968-1973.
116. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L: **p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis.** *J Clin Oncol* 1995, **13**(4):821-830.
117. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwege D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, Tzontcheva AT, Sidlofsky S, Hanna WM, Qizilbash AH *et al*: **The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(1):86-96.
118. Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C, Chacon I, Sanchez R, Carballido J, Colas A *et al*: **Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors.** *Mutat Res* 2003, **530**(1-2):9-17.
119. Sinha S, Chunder N, Mukherjee N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Kumar Panda C: **Frequent deletion and methylation in SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma.** *Ann Surg Oncol* 2008, **15**(4):1070-1080.
120. Roa JC, Anabalón L, Tapia O, Martínez J, Araya JC, Villaseca M, Guzmán P, Roa I: **[Promoter methylation profile in breast cancer].** *Revista medica de Chile* 2004, **132**(9):1069-1077.
121. Zemliakova VV, Zhevlova AI, Strel'nikov VV, Liubchenko LN, Vishnevskaya Ia V, Tret'iakova VA, Zaletaev DV, Nemtsova MV: **[Abnormal methylation of several tumor suppressor genes in sporadic breast cancer].** *Molekuliarnaia biologii* 2003, **37**(4):696-703.
122. Tao MH, Shields PG, Nie J, Millen A, Ambrosone CB, Edge SB, Krishnan SS, Marian C, Xie B, Winston J *et al*: **DNA hypermethylation and clinicopathological features in breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **114**(3):559-568.
123. Jing F, Zhang J, Tao J, Zhou Y, Jun L, Tang X, Wang Y, Hai H: **Hypermethylation of tumor suppressor genes BRCA1, p16 and 14-3-3sigma in serum of sporadic breast cancer patients.** *Onkologie* 2007, **30**(1-2):14-19.
124. Swisshelm K, Ryan K, Lee X, Tsou HC, Peacocke M, Sager R: **Down-regulation of retinoic acid receptor beta in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells.** *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 1994, **5**(2):133-141.
125. Dietze EC, Caldwell LE, Marcom K, Collins SJ, Yee L, Swisshelm K, Hobbs KB, Bean GR, Seewaldt VL: **Retinoids and retinoic acid receptors regulate growth arrest and apoptosis in human mammary epithelial cells and modulate expression of CBP/p300.** *Microsc Res Tech* 2002, **59**(1):23-40.

126. Wang Y, Fang MZ, Liao J, Yang GY, Nie Y, Song Y, So C, Xu X, Wang LD, Yang CS: **Hypermethylation-associated inactivation of retinoic acid receptor beta in human esophageal squamous cell carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(14):5257-5263.
127. Bagadi SA, Prasad CP, Kaur J, Srivastava A, Prashad R, Gupta SD, Ralhan R: **Clinical significance of promoter hypermethylation of RASSF1A, RARbeta2, BRCA1 and HOXA5 in breast cancers of Indian patients.** *Life Sci* 2008, **82**(25-26):1288-1292.
128. Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, Battagli C, Ehya H, Klein-Szanto A, Cairns P: **Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(1 Pt 1):28-32.
129. Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Ralhan R: **Detection of RASSF1A and RARbeta hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients.** *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2006, **1**(2):88-93.
130. Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, Nedwidek M, Chen T, Zhang XF, Seed B, Avruch J: **Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway.** *Current biology : CB* 2002, **12**(4):253-265.
131. Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, Huan S, Huang M, Liu J, Sahin AA *et al*: **Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers.** *Breast Cancer Res* 2007, **9**(4):R57.
132. Hesson LB, Cooper WN, Latif F: **The role of RASSF1A methylation in cancer.** *Dis Markers* 2007, **23**(1-2):73-87.
133. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A: **DAP-kinase is a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity.** *The EMBO journal* 1997, **16**(5):998-1008.
134. Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Spivak-Kroizaman T, Feinstein E, Kimchi A: **DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain.** *J Cell Biol* 1999, **146**(1):141-148.
135. Levy-Strumpf N, Kimchi A: **Death associated proteins (DAPs): from gene identification to the analysis of their apoptotic and tumor suppressive functions.** *Oncogene* 1998, **17**(25):3331-3340.
136. Lehmann U, Celikkaya G, Hasemeier B, Langer F, Kreipe H: **Promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene in breast cancer is associated with the invasive lobular subtype.** *Cancer Res* 2002, **62**(22):6634-6638.
137. Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T, Cairns P: **Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(18 Pt 1):6189-6193.
138. Hopkins TG, Burns PA, Routledge MN: **DNA methylation of GSTP1 as biomarker in diagnosis of prostate cancer.** *Urology* 2007, **69**(1):11-16.
139. Ketterer B: **Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage.** *Free radical research* 1998, **28**(6):647-658.
140. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG: **Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia.** *Cancer Res* 1998, **58**(20):4515-4518.
141. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, Taback B: **Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(6):2156-2162.
142. Esteller M, Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, Garcia-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ *et al*: **CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas.** *Clinical Cancer Research* 2004, **10**(15):4933-4938.

143. Esteller M, Herman JG: **Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O-6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer.** *Oncogene* 2004, **23**(1):1-8.
144. Munot K, Bell SM, Lane S, Horgan K, Hanby AM, Speirs V: **Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer.** *Hum Pathol* 2006, **37**(8):989-999.
145. Landis JR, Koch GG: **The measurement of observer agreement for categorical data.** *Biometrics* 1977, **33**(1):159-174.
146. Aida Laurinaviciene, Darius Dasevicius, Valerijus Ostapenko, Sonata Jarmalaite, Juozas Lazutka, Arvydas Laurinavicius: **Membrane connectivity estimated by digital image analysis of HER2 immunohistochemistry is concordant with visual scoring and fluorescence in situ hybridization results: algorithm evaluation on breast cancer tissue microarrays.** *Diagnostic Pathology* 2011.
147. Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, Ashworth A, Reis-Filho JS: **Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis.** *Lancet Oncol* 2010, **11**(4):339-349.
148. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG *et al*: **The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines.** *Breast Cancer (Auckl)* 2010, **4**:35-41.
149. Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA, Cotsonis GA, Cohen C: **Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study.** *ApplImmunohistochemMolMorphol* 2010, **18**(5):433-441.
150. Parisi F, González AM, Nadler Y, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM, Kluger Y: **Benefits of biomarker selection and clinico-pathological covariate inclusion in breast cancer prognostic models.** *Breast Cancer Research* 2010, **12**(5):R66.
151. Santisteban M, Reynolds C, Barr Fritcher EG, Frost MH, Vierkant RA, Anderson SS, Degnim AC, Visscher DW, Pankratz VS, Hartmann LC: **Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast cancer in atypical hyperplasia.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **121**(2):431-437.
152. Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, Provenzano E, Leung S, Nielsen T, Pharoah PD, Caldas C: **A Ki67/BCL2 index based on immunohistochemistry is highly prognostic in ER-positive breast cancer.** *J Pathol* 2011.
153. Mollerstrom E, Kovacs A, Lovgren K, Nemes S, Delle U, Danielsson A, Parris T, Brennan DJ, Jirstrom K, Karlsson P *et al*: **Up-regulation of cell cycle arrest protein BTG2 correlates with increased overall survival in breast cancer, as detected by immunohistochemistry using tissue microarray.** *BMC Cancer* 2010, **10**:296.
154. Pierceall WE, Wolfe M, Suschak J, Chang H, Chen Y, Sprott KM, Kutok JL, Quan S, Weaver DT, Ward BE: **Strategies for H-score normalization of preanalytical technical variables with potential utility to immunohistochemical-based biomarker quantitation in therapeutic response diagnostics.** *Anal Cell Pathol (Amst)* 2011, **34**(3):159-168.
155. Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y: **Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index.** *Histopathology* 2006, **48**(6):674-682.
156. Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P, Baker J, Cronin M, Liu ML, Borchik R, Mosquera JM, Walker MG, Shak S: **Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(24 Pt 1):8623-8631.

157. Pandya AY, Talley LI, Frost AR, Fitzgerald TJ, Trivedi V, Chakravarthy M, Chhieng DC, Grizzle WE, Engler JA, Krontiras H *et al*: **Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(8):2709-2719.
158. Habashy HO, Powe DG, Abdel-Fatah TM, Gee JM, Nicholson RI, Green AR, Rakha EA, Ellis IO: **A review of the biological and clinical characteristics of luminal-like oestrogen receptor-positive breast cancer.** *Histopathology* 2011.
159. Khoshnaw SM, Powe DG, Ellis IO, Green AR: **Detection and quantification of microRNAs in laser-microdissected formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues.** *Methods Mol Biol* 2011, **755**:119-142.
160. Masmoudi H, Hewitt SM, Petrick N, Myers KJ, Gavrielides MA: **Automated quantitative assessment of HER-2/neu immunohistochemical expression in breast cancer.** *IEEE Trans Med Imaging* 2009, **28**(6):916-925.
161. Turashvili G, Leung S, Turbin D, Montgomery K, Gilks B, West R, Carrier M, Huntsman D, Aparicio S: **Inter-observer reproducibility of HER2 immunohistochemical assessment and concordance with fluorescent in situ hybridization (FISH): pathologist assessment compared to quantitative image analysis.** *BMC Cancer* 2009, **9**:165.
162. Bolton KL, Garcia-Closas M, Pfeiffer RM, Duggan MA, Howat WJ, Hewitt SM, Yang XR, Cornelison R, Anzick SL, Meltzer P *et al*: **Assessment of automated image analysis of breast cancer tissue microarrays for epidemiologic studies.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**(4):992-999.
163. Dobson L, Conway C, Hanley A, Johnson A, Costello S, O'Grady A, Connolly Y, Magee H, O'Shea D, Jeffers M *et al*: **Image analysis as an adjunct to manual HER-2 immunohistochemical review: a diagnostic tool to standardize interpretation.** *Histopathology* 2010, **57**(1):27-38.
164. Minot DM, Kipp BR, Root RM, Meyer RG, Reynolds CA, Nassar A, Henry MR, Clayton AC: **Automated cellular imaging system III for assessing HER2 status in breast cancer specimens: development of a standardized scoring method that correlates with FISH.** *Am J Clin Pathol* 2009, **132**(1):133-138.
165. Skaland I, Ovestad I, Janssen EA, Klos J, Kjellevold KH, Helliesen T, Baak JP: **Digital image analysis improves the quality of subjective HER-2 expression scoring in breast cancer.** *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008, **16**(2):185-190.
166. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO: **Combinatorial biomarker expression in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **120**(2):293-308.
167. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Ball G, Lopez-Garcia MA, Habashy HO, Green AR, Reis-Filho JS, Ellis IO: **Proposal for a modified grading system based on mitotic index and Bcl2 provides objective determination of clinical outcome for patients with breast cancer.** *J Pathol* 2010, **222**(4):388-399.
168. Kallel-Bayoudh I, Hassen HB, Khabir A, Boujelbene N, Daoud J, Frikha M, Sallemi-Boudawara T, Aifa S, Rebai A: **Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma.** *Med Oncol* 2010.
169. Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C: **Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer.** *BMC Cancer* 2008, **8**:153.
170. Aleskandarany MA, Rakha EA, Macmillan RD, Powe DG, Ellis IO, Green AR: **MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, **127**(3):591-599.
171. Han HJ, Russo J, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T: **SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis.** *Nature* 2008, **452**(7184):187-193.

172. Patani N, Jiang W, Mansel R, Newbold R, Mokbel K: **The mRNA expression of SATB1 and SATB2 in human breast cancer.** *Cancer Cell Int* 2009, **9**:18.
173. Yamayoshi A, Yasuhara M, Galande S, Kobori A, Murakami A: **Decoy-DNA against special AT-rich sequence binding protein 1 inhibits the growth and invasive ability of human breast cancer.** *Oligonucleotides* 2011, **21**(2):115-121.
174. Hanker LC, Karn T, Mavrova-Risteska L, Ruckhaberle E, Gaetje R, Holtrich U, Kaufmann M, Rody A, Wiegatz I: **SATB1 gene expression and breast cancer prognosis.** *Breast* 2011, **20**(4):309-313.
175. Kohwi-Shigematsu T, Han HJ, Russo J, Kohwi Y: **Re: The role of SATB1 in breast cancer pathogenesis.** *J Natl Cancer Inst* 2010, **102**(24):1879-1880; author reply 1880-1871.
176. Keith B, Johnson RS, Simon MC: **HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression.** *Nature reviews Cancer* 2011, **12**(1):9-22.
177. Yamamoto Y, Ibusuki M, Okumura Y, Kawasoe T, Kai K, Iyama K, Iwase H: **Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **110**(3):465-475.
178. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E: **Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma.** *Cancer* 2003, **97**(6):1573-1581.
179. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G: **Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**(6):1831-1837.
180. Dales JP, Beaufile N, Silvy M, Picard C, Pauly V, Pradel V, Formisano-Treziny C, Bonnier P, Giusiano S, Charpin C *et al*: **Hypoxia inducible factor 1alpha gene (HIF-1alpha) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer.** *BMC medicine* 2010, **8**:44.
181. Subhawong AP, Subhawong T, Nassar H, Kouprina N, Begum S, Vang R, Westra WH, Argani P: **Most basal-like breast carcinomas demonstrate the same Rb-/p16+ immunophenotype as the HPV-related poorly differentiated squamous cell carcinomas which they resemble morphologically.** *Am J Surg Pathol* 2009, **33**(2):163-175.
182. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Hilmarsdottir H, Olafsdottir G, Esteller M, Johannsson OT, Eyfjord JE: **CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer.** *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2011, **6**(5):638-649.
183. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Bjarnason H, Th Johannsson O, Bodvarsdottir SK, Valgeirsdottir S, Eyfjord JE: **Genomic and phenotypic analysis of BRCA2 mutated breast cancers reveals co-occurring changes linked to progression.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**(5):R95.
184. Karray-Chouayekh S, Baccouche S, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Jlidi R, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R: **Prognostic significance of p16INK4a/p53 in Tunisian patients with breast carcinoma.** *Acta Histochem* 2011, **113**(5):508-513.
185. Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Sugihara E, Abe E, Yoshida A, Mikami S, Nakamura S *et al*: **Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer.** *Int J Cancer* 2011.



## 10. PRIEDAI

Priedas Nr. 1. Lietuvos biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas.



### LIETUVOS BIOETIKOS KOMITETAS

Kodas 188710595, Didžioji g. 22, LT-01128 Vilnius, tel./faks. + (370~5) 212 45 65, www.sam.lt/bioetika

#### LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2007-08-03 Nr.: 33

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: <b>„Molekulinių krūties vėžio žymenų vertė nustatant ligos eigos ir gydymo ypatumus“</b>
Protokolo Nr.: <b>40</b> Data: <b>2007 m. balandžio 26 d.</b>
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma (priedas Nr. 1)
Pagrindinis tyrėjas: <b>Aida Laurinavičienė</b>
Biomedicininio tyrimo vieta: Įstaigos pavadinimas: <b>Vilniaus universiteto Onkologijos institutas</b> Įstaigos adresas: <b>Žygimantų 9, Vilnius</b> Įstaigos pavadinimas: <b>Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Ekologinės genetikos laboratorija</b> Įstaigos adresas: <b>M.K.Čiurlionio21/9</b> Įstaigos pavadinimas: <b>Valstybinis patologijos centras</b> Įstaigos adresas: <b>P. Baublio 5</b>

Leidimas išduotas Lietuvos bioetikos komiteto posėdžio, įvykusio **2007 m. liepos 13 d.**, sprendimu.

Lietuvos bioetikos komiteto biomedicininų tyrimų ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1	Gyd. Gintarė Breivienė	Pediatrija	ne
2	Gyd. Vytautas Čepulis	Onkologija	taip
3	Doc. Eugenijus Gefenas	Bioetika	taip
4	Doc. Zita Liubarskienė	Filosofija	taip
5	Dr. Andrius Narbekovas	Teologija	taip
6	Prof. Algimantas Raugalė	Pediatrija	ne
7	Doc. Krescentius Stoškus	Filosofija	taip
8	Gyd. Vytautas Tutkus	Mikrochirurgija	taip
9	Dalia Zeleckienė	Teisė	ne

Lietuvos bioetikos komitetas dirba vadovaudamasis Geros Klinikinės Praktikos taisyklėmis, kurias siūloma priimti Europos Sąjungos, Japonijos ir JAV valdžios struktūroms

Pirmininkas



Eugenijus Gefenas

## 11. PADĖKA

Esu dėkinga už paramą ir pagalbą savo nuostabiai šeimai:

Vyriui, Arvydui, kuris paskatino mane atlikti šį darbą – dėkinga už tikėjimą, kad galiu padaryti daugiau nei pati manau, už paskatinimą ir padrąšinimą žvelgti giliau, matyti plačiau, eiti toliau. Dėkinga už suteiktas naujas žinias, ilgas diskusijas ir kantrų bendrą darbą;

Mamai, be kurios paramos, rūpesčio, šilumos ir kantrybės sunku būtų pradėti bet kokį naują darbą. Esu laiminga jausdama ją šalia; tėčiui, kurio šviesus atminimas skatina nuolat mane tobulėti; seseriai, Ingai. Mylimiems vaikams – Ugnei, Guodai, Ievutei, Kristutei ir Rokui, kurie kantriai laukė laiko, kada mama bus laisvesnė.

Nuoširdžiai dėkoju:

Visiems Valstybinio patologijos centro Patologinių tyrimų laboratorijos darbuotojams už techninę pagalbą ir moralinį palaikymą visų doktorantūros studijų metu;

Dariui Dasevičiui, Valstybinio patologijos centro patologui – už išsamias navikinio audinio pažinimo pamokas;

Evaldui Burbuliui – už įsimintinas audinių mikrogardelių ruošimo pamokas;

Prof. P.K.Valuckui, Vilniaus universiteto Onkologijos instituto direktoriui ir instituto darbuotojų kolektyvui už suteiktas žinias, vertingas pastabas ir paramą rengiant šį darbą. Ypatingus padėkos žodžius noriu tarti prof. Janinai Didžiapetrienei, kuri išvelgė manyje tyrėją ir nuo pirmųjų žingsnių šioje darbų kryptyje mane globojo, sunkesniais momentais padrąsino, mokė ir patarė;

Gražinai Pruskuvienei, lietuvių kalbos redaktorei – už taisyklingos lietuvių kalbos pamokas;

Prof. Paulett Herlin, Nicolas Elie, Benoit Plancoulaine, dr. Catherine Bor, Prancūzijos Kanų vėžio tyrimų centras (François Baclesse Cancer Centre, Kanai, Prancūzija) – už nuoširdžias, didžiuliu užsidegimu, entuziazmu bei šiluma sklidas skaitmeninių vaizdų analizės pamokas.

Prof. Juozui Lazutkai, Vilniaus universiteto Botanikos ir genetikos katedra – už bendradarbiavimą projektiniuose darbuose;

Prof. Sonatai Jarmalaitei, Vilniaus universiteto Botanikos ir genetikos katedra;

Prof. Dainiui Characiejui ir habil dr. Valerijui Ostapenko, Vilniaus universiteto Onkologijos institutas.

Bendravimą su visais šiais ir kitais žmonėmis prisimenu su dėkingumu.